

ULTRASTRUKTUR OOSIT KAMBING PASCA KRIOPRESERVASI DENGAN METODE VITRIFIKASI

Ultrastructure of Goat's Oocyte After Cryopreservation Using Vitrification Method

Sri Wahjuningsih¹ dan Sasmito Djati²

¹Jurusan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

²Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: yuning@ub.ac.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah mengetahui ultrastruktur oosit pasca vitrifikasi menggunakan transmisi elektron mikroskop. Ovarium dikumpulkan dari rumah potong hewan dan oosit dikoleksi dengan cara aspirasi dari folikel menggunakan jarum ukuran 18 G. Setelah dilakukan klasifikasi kualitas oosit, maka oosit yang berkualitas A dimaturnasi secara *in vitro*. Oosit hasil maturasi dipaparkan ke dalam larutan vitrifikasi yang mengandung 30% EG + 0,5 M sukrosa dengan lama waktu paparan 3 menit, oosit dimasukkan ke dalam *ministraw* 0,25 cc (*French straw*), kemudian dipaparkan pada uap nitrogen selama 10 detik dan dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair. Setelah 3 minggu *ministraw* diambil dan dilakukan penghangatan (*warming*) di udara selama 10 detik, dimasukkan dalam *waterbath* suhu 35° C selama 30 detik. Isi *ministraw* dituangkan ke dalam cawan petri dan oosit dibilas dua kali dengan sukrosa 0,5 M. Selanjutnya dilakukan pengamatan ultrastruktur oosit dengan transmisi elektron mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan oosit hasil vitrifikasi mempunyai zona pelusida yang abnormal (fraktur), membran plasma mengalami lisis, beberapa butir korteks mengalami degenerasi dan perpindahan butir korteks di ruang perivitelin. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perubahan ultrastruktur pada oosit setelah vitrifikasi.

Kata kunci: ultrastruktur, oosit, vitrifikasi, kambing

ABSTRACT

The aim of this research was to analyzed ultrastructural of cryopreserved oocyte using vitrification method by transmission electron microscope (TEM). Ovarium was collected from slaughter house and oocyte was collected by aspirated using 18 G needle form follicle. The classification of oocyte quality was perform, then grade A quality oocytes was matured in vitro. Matured oocyte was exposed to vitrification solution containing 30% EG + 0.5 M sucrose for 3 minute, then oocyte was put into translucent ministraw 0.25 cc (French straw), followed by exposed to nitrogen gas for 10 second and stored in liquid nitrogen container. After 3 weeks ministraw was collected and thawed for 10 second, then placed in waterbath at 35° C for 30 second. Ministraw contained was put out into petridish and oocyte was washed twice with 0.5 M sucrose. The results of the research showed that cryopreserved oocyte using vitrification caused ultrastructural change: zona fracture, lysis of plasm membrane, change of cortical granule position to perivitelin space and degeneration of cortical granule. The conclusion of this research was that vitrification caused ultrastructural change in goat oocyte.

Key words: ultrastructural, oocyte, vitrification

PENDAHULUAN

Produksi embrio *in vitro* merupakan alternatif yang bisa dimanfaatkan untuk mendapatkan embrio dalam program transfer embrio. Produksi embrio secara *in vitro* yang meliputi maturasi oosit, fertilisasi dan kultur *in vitro* telah dilaporkan pada hewan ternak kambing dan sapi (Wahjuningsih dan Djati, 2011; Wahjuningsih dan Ritasari, 2012). Aplikasi teknologi fertilisasi *in vitro* akan lebih fleksibel dan bermanfaat apabila dapat memanfaatkan oosit beku (*frozen oocyte*) berkualitas baik karena oosit segar memiliki viabilitas yang sangat terbatas sehingga tidak dapat disimpan dalam waktu yang lama pada suhu kamar (Celestino *et al.*, 2008; Cobo *et al.*, 2010; Wahjuningsih *et al.*, 2010). Sampai saat ini keberhasilan kriopreservasi oosit yang telah dilaporkan masih sangat terbatas dan hasilnya sangat variatif (Vajta, 2000; Acker dan Locksley, 2003; Hovatta, 2004; Lucci *et al.*, 2004). Walaupun terdapat metode konvensional, namun saat ini metode vitrifikasi lebih sering diaplikasikan (Shaw *et al.*, 2000; Kasai, 2002; Bonetti *et al.*, 2011).

Masalah yang timbul dari proses vitrifikasi adalah toksisitas krioprotektan. Penelitian sebelumnya

menunjukkan bahwa etilen glikol (EG) mempunyai efek toksik yang lebih rendah dibandingkan krioprotektan yang lain (Hochi *et al.*, 1995), namun evaluasi pengaruh sitologis setelah perlakuan menunjukkan kerusakan permanen yang tidak tampak setelah paparan krioprotektan (Han dan Bischof, 2004; Coticchio *et al.*, 2010). Penelitian ini bertujuan mengamati ultrastruktur oosit oosit hasil *in vitro* maturation (IVM) yang telah mengalami proses vitrifikasi menggunakan EG 30% dengan lama paparan 3 menit.

MATERI DAN METODE

Koleksi Oosit

Ovarium dikumpulkan dari rumah potong hewan (RPH) dalam keadaan segar dan dimasukkan dalam medium berisi NaCl 0,9% + penisilin 100 IU + streptomisin 100 IU pada suhu 35° C. Oosit dikoleksi dengan cara aspirasi dari folikel menggunakan jarum dengan ukuran 18 G (Wahjuningsih, 2004). Medium aspirasi terdiri atas *tissue culture medium* (TCM) 199 powder (Gibco) ditambahkan 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Sigma), dan

sodium bicarbonate (NaHCO_3 , Sigma) difiltrasi menggunakan membran filter diameter 0,22 μm (Sartorius). Evaluasi kualitas oosit *immature* dilakukan berdasarkan kriteria Hozumi (2001). Hanya oosit yang mempunyai sitoplasma kompak secara sempurna dengan sel-sel kumulus beraturan menempel pada keseluruhan bagian oosit (kualitas A) yang digunakan.

Maturasi Oosit *In Vitro*

Setelah dilakukan klasifikasi kualitas oosit, maka oosit yang berkualitas A dimaturasi secara *in vitro* dengan medium TCM199 + *fetal calf serum* (FCS) 10% + *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG) 10 IU + *human chorionic gonadotropin* (hCG) 10 IU selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 39° C dan 5% CO_2 , kelembaban 95%.

Vitrifikasi Oosit dan *Warming*

Oosit hasil IVM dipaparkan ke dalam larutan vitrifikasi yang mengandung 30% EG + 0,5 M sukrosa dengan lama waktu paparan 3 menit, kemudian oosit dimasukkan ke dalam *ministraw* transparan 0,25 cc (*French straw*), kemudian dipaparkan pada uap nitrogen selama 10 detik dan dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair. Setelah 3 minggu *ministraw* diambil, dan dilakukan penghangatan (*warming*) di udara selama 10 detik lalu dimasukkan dalam *waterbath* suhu 35° C selama 30 detik. Isi *ministraw* dituangkan ke dalam cawan petri dan oosit dibilas dua kali dengan sukrosa 0,5 M.

Analisis Ultrastruktur Oosit

Pengamatan ultrastruktur oosit dengan transmisi elektron mikroskop (TEM) berdasarkan Fuku *et al.*, (1995) dan Djuwita (2001) setelah dimodifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa kualitas oosit terbaik dihasilkan pasca vitrifikasi menggunakan EG 30% dengan lama paparan 3 menit, selanjutnya pada penelitian ini dilakukan pengamatan ultrastruktur. Zona pelusida (ZP) oosit setelah vitrifikasi dapat diklasifikasikan berdasarkan morfologi normal dan tidak normal. Oosit hasil vitrifikasi menunjukkan bentuk yang abnormal (fraktur) seperti yang disajikan pada Gambar 1, sedangkan oosit segar (tidak mengalami vitrifikasi) mempunyai zona pelusida yang masih utuh seperti yang disajikan pada Gambar 2. Interaksi spermatozoa dan sel telur terjadi melalui beberapa fase pada permukaan oosit, yang diawali dengan perlekatan pada matriks ekstraseluler dan selanjutnya pada membran plasma oosit (Evan, 2000). Pada rangkaian proses interaksi tersebut ZP memegang peranan penting. Ikatan spermatozoa pada ZP adalah interaksi spesifik yang merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Setelah penembusan ZP maka spermatozoa berada dalam ruang perivitelin dan menempel pada membran vitelin. Proses vitrifikasi

dapat merusak ZP, membran plasma, dan sitoplasma sehingga menyebabkan oosit berdegenerasi (Coticchio *et al.*, 2010; Gualtieri *et al.*, 2010). Terjadinya abnormalitas pada ZP seperti fraktur menyebabkan hambatan terjadinya proses fertilisasi. Fuku *et al.* (1995) dan Men *et al.* (2003) menyebutkan bahwa pembekuan dapat menyebabkan perubahan ZP, yaitu terjadinya pengerasan (*hardening*) yang menyebabkan penurunan angka fertilisasi.

Perubahan ultrastruktur yang terjadi pada oosit setelah vitrifikasi adalah terjadinya perpindahan posisi serta degenerasi dari butir-butir korteks serta terbentuknya vesikel besar. Peneliti lain juga mendapatkan beberapa butir korteks mengalami degenerasi dengan eksositosis seperti yang terlihat dari adanya sisa-sisa butir korteks di ruang perivitelin (Noyes *et al.*, 2010; Salvetti *et al.*, 2010).

Fusi dari kortikal granula dalam oosit dengan membran plasma oosit dan deposisi kandungan kortikal granula dalam ruang perivitelin menyebabkan reaksi zona untuk memblok polispermi. Hambatan terhadap polispermi adalah peristiwa awal yang sangat penting selama aktivasi oosit. Fertilisasi oosit yang telah mengalami kerusakan menyebabkan reaksi kortikal granula tidak sempurna yang akan mengakibatkan polispermi (Burkin dan Muller, 2000). Perubahan pada butir-butir korteks diduga sebagai faktor penyebab terjadinya polispermi pada oosit setelah vitrifikasi (Wahjuningsih *et al.*, 2010).

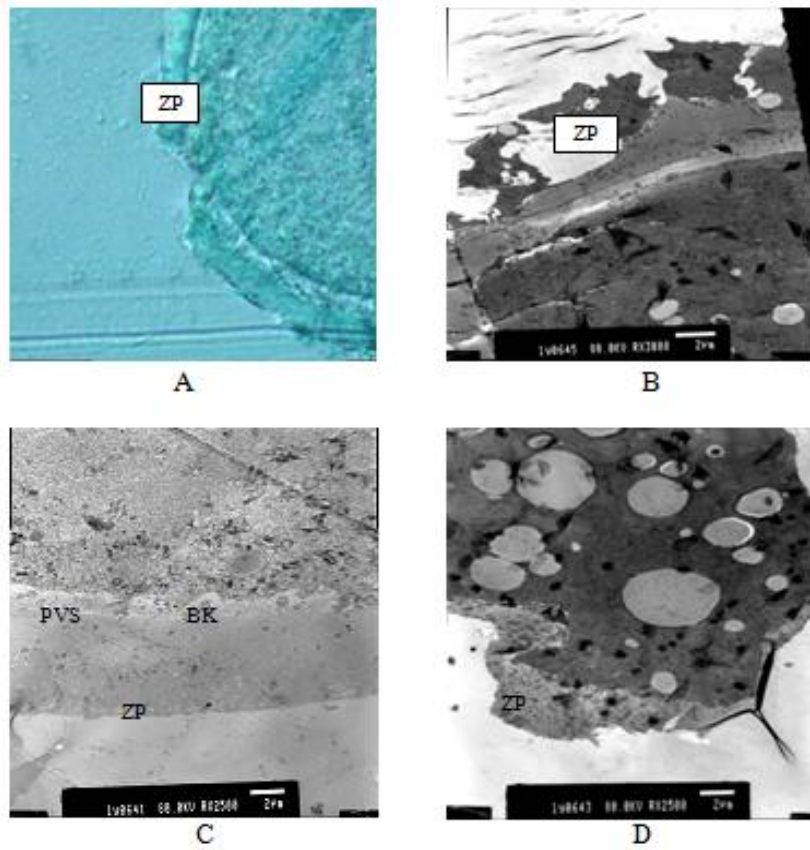
Hasil penelitian Fuku *et al.* (1995) menunjukkan bahwa oosit hasil vitrifikasi menunjukkan membran plasma mengalami lisis, butir korteks, dan mitokondria berdegenerasi. Kerusakan tersebut karena Kristal es yang terbentuk (Bonettiet *al.*, 2011). Faktor yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan adalah terjadinya dehidrasi baik dari suspensi media intra dan ekstra seluler sehingga oosit mengalami pengerutan maupun pembengkakan (*swelling*) sehingga strategi yang digunakan untuk menghindari toksisitas larutan vitrifikasi adalah memperpendek waktu pemaparan. Namun jika waktu pemaparan terlalu pendek, maka penyerapan krioprotektan tidak cukup, sehingga esintra seluler masih dapat terbentuk (Kasai, 2002).

KESIMPULAN

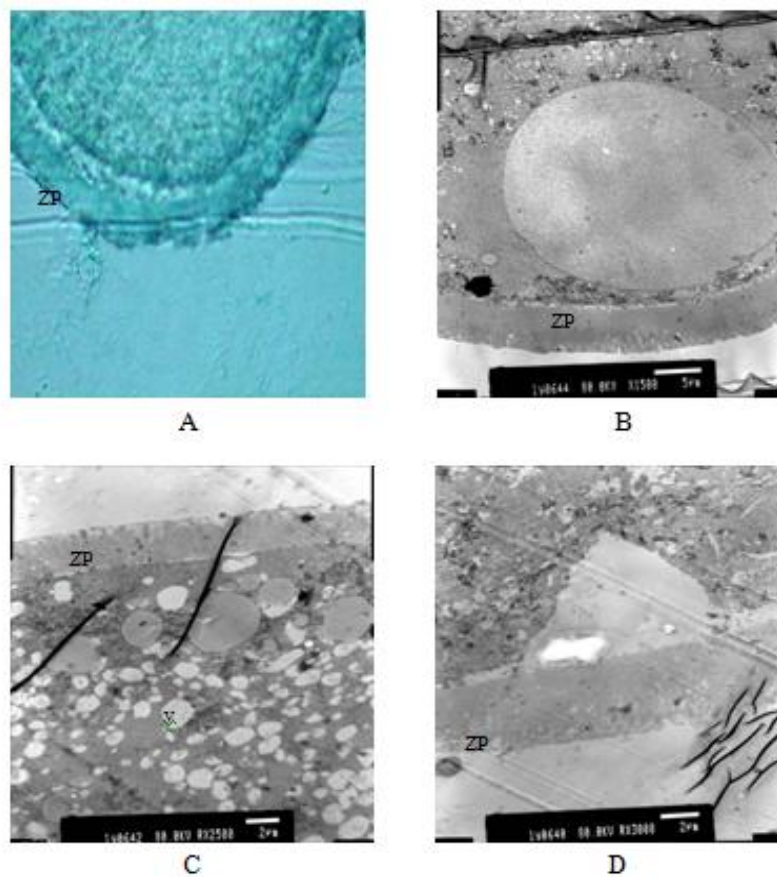
Terdapat perubahan ultrastruktur oosit metafase II (M-II) kambing setelah vitrifikasi yaitu abnormalitas zona pelusida, membran plasma, perpindahan posisi, serta degenerasi dari butir-butir korteks.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat yang telah membiayai penelitian ini melalui Penelitian Fundamental serta Lembaga Biologi Molekuler Eijkman atas fasilitas transmisi elektron mikroskop.



Gambar 1. Oosit setelah vitrifikasi (ZP= zona pelusida; BK= butir korteks; PVS= *perivitelin space*)



Gambar 2. Oosit tanpa perlakuan vitrifikasi (ZP= zona pelusida, V= vesikel)

DAFTAR PUSTAKA

- Acker, J.P., and E.M. Locksley. 2003. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology** 46:197-202.
- Bonetti, A. M. Cervi, F. Tomei, M. Marchini, F. Ortolani, and M. Manno. 2011. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. **Fertil. Steril.** (95):928-935.
- Burkin, H.R. and D.J. Muller. 2000. Zonapellucida protein binding ability of porcine sperm during epididymal maturation and the acrosomal reaction. **Dev. Biol.** 222(1):99-109.
- Coticchio, G., A. Borini, V. Distratis, M. Maione, G. Scaravelli, V. Bianchi, G. Machiarelli, and S.A. Nottola. 2010. Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. **J. Assist. Reprod. Genet.** (27):131-140.
- Celestino, J.D.H., R.R.D. Santos, and C.A.P. Lopes. 2008. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultrastructure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Anim. Reprod. Sci.** 108(3):309-318.
- Cobo, A., M. Meseguer, J. Remohi, and A. Pellicer. 2010. Use of cryobanked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. **Hum. Reprod.** (25):2239-2246.
- Djuwita, I. 2001. Kajian Morfologis dan Fungsi Biologis Oosit Domba Setelah Kriopreservasi dengan Metode Vitrikifikasi. **Disertasi.** Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Evan, J.P. 2000. Getting sperm and eggs together: Things conserved and thing diverged. **Biol. Reprod.** 63(2):355-360.
- Fuku E, L. Xia, and B.R. Downey. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology** 32(2):139-156.
- Gualtieri, R., V. Mollo, V. Barbato, M. Laccarino, and R. Talevi. 2010. Ultrastructure and intracellular calcium response to ionophore A 23187 in human oocytes after vitrification. **Hum. Reprod.** (25):93-98.
- Han, B. and J.C. Bischof. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. **Cryobiology** 48:8-21.
- Hochi, S., T. Fujimoto, and N. Oguri. 1995. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. **Theriogenology** 42:236-240.
- Hovatta, O. 2004. Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. **European J. Obstet. Gynecol. Reproduct. Biol.** (113):50-54.
- Hozumi, T. 2001. **Reproductive Biology and Biotechnology.** Japan International Cooperation Agency. Indonesia.
- Kasai, M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultra rapid vitrification. **Reproduct. Med. Biol. Rev.** 1:1-9.
- Lucci, M., R.V. Silva, and C.A. Carvalho, R. Figueiredo, and N. B ao. 2001. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Res.** 41(1):61-69.
- Men, H., R.L. Monson, J.J. Parrish, and J.J. Rutledge. 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology** 47:73-81.
- Noyes, N., J. Knopman, P. Labelle, C. McCaffrey, M. Clark-Williams, and J. Grifo. 2010. Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes. **Fertil. Steril.** (94):2078-2082.
- Salveti, P., S. Buff, M. Afanassieff, N. Daniel, P. Guerin, and T. Joly. 2010. Structural, metabolic, and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. 2010. **Theriogenology** (74):847-855.
- Shaw, J.M., A. Oranrathachai, and A.O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology** 53:59-72.
- Vajta, G. 2000. **Vitrification of Bovine Oocytes and Embryo.** Embryo Technology Center, Danish Institute of Agricultural Sciences, Denmark.
- Wahjuningsih, S. 2004. Analisis Pengaruh Vitrikifikasi terhadap Viabilitas dan Struktur Oosit Sapi. **Disertasi.** Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wahjuningsih, S., S. Hardjopranjoto, dan S.B. Sumitro. 2010. Pengaruh konsentrasi etilen glikol dan lama paparan terhadap tingkat fertilitas *in vitro* oosit sapi. **Jurnal Kedokteran Hewan** 4(2):61-64.
- Wahjuningsih, S., and M.S. Djati. 2011. Study of estrus cow serum (ECS) in maturation medium on *in vitro* maturation rate of bovine oocytes. **J. Agricult. Sci. Tech.** 1(8):1174-1176.
- Wahjuningsih, S. and P.M. Ritasari. 2012. The cumulus cells expansion of *in vitro* maturation oocyte from prepuberty and puberty goat. **4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2012) Osaka, Japan.** 30 August-2 September 2012.