

Perbandingan Viabilitas Oosit Domba Pasca Vitrifikasi dengan Menggunakan Hemistraw dan Cryotop

(Comparison of sheep oocyte viability after vitrification using hemistraw and cryotop)

Kikin Winangun¹, Rini Widyastuti^{1,2} dan Mas Rizky Anggun Adipurna Syamsunarno^{3,4}

¹Laboratorium Reproduksi dan Inseminasi Buatan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran,

²Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran,

³Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran,

⁴Program Studi Bioteknologi Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Padjadjaran

ABSTRAK Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji efek vitrifikasi dengan menggunakan dua buah system carrier yang berbeda terhadap viabilitas oosit domba yang telah dimaturasi secara *in vitro*. Oosit dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, yaitu (i) divitrifikasi dengan menggunakan *hemistraw* (ii) divitrifikasi dengan menggunakan *cryotop*. Viabilitas oosit dievaluasi berdasarkan reekspansi, warna dan homogenitas sitoplasma. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas oosit setelah vitrifikasi serupa pada kedua jenis carrier yang digunakan untuk vitrifikasi. Oosit diletakkan dalam larutan equilibrasi yang mengandung konsentrasi permeable krioprotektan setengah dari larutan vitrifikasi. Setelah 15 menit,

oosit ditransfer ke dalam media vitrifikasi yang mengandung 17% EG+17% DMSO +0, 65M sukrosa di dalam *modified PBS* yang disuplementasi dengan 20% *fetal bovine serum*. Total waktu yang digunakan untuk memaparkan oosit ke dalam larutan vitrifikasi adalah 30 detik. 5-8 oosit dipipet menggunakan kapiler gelas dan diletakkan/loading ke dalam *carrier* yang digunakan (*hemistraw* atau *cryotop*) kemudian langsung dipaparkan ke dalam nitrogen cair. Viabilitas oosit dievaluasi berdasarkan reekspansi, warna dan homogenitas sitoplasma. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas oosit setelah vitrifikasi serupa pada kedua jenis carrier yang digunakan untuk vitrifikasi

Kata kunci: Oosit, vitrifikasi, viabilitas, *hemistraw*, *cryotop*.

ABSTRACT The aim of this study was to examine the effect vitrification using two different carrier system on the matured sheep oocytes viability. Oocytes were divided into two group (i) vitrified using *hemistraw* (ii) vitrified using *cryotop*. Oocytes placed into equilibration solution which is containing a half concentration permeable cryoprotectant of vitrification solution. After 15 minute, oocytes were transferred into vitrification solution containing 17% EG+17% DMSO +0, 65M sucrose in modified PBS supplemented with 20% fetal bovine serum. The total exposure time of

oocytes to vitrification solution was 30 sec. Oocytes were pipetted into a glass capillary into group 5-8, and loaded into carrier (*hemistraw* or *cryotop*) then plugged into liquid nitrogen. After a week cryopreservation, oocytes were warmed and cultured in TCM 199 supplemented with 10% fetal bovine serum at 38.50 C under 5% CO₂ for 3h. Oocytes viability was evaluated by re expansion, color and homogeneity of oocyte cytoplasm. Our results indicated that the oocytes viability after vitrification was similar from both of carrier for vitrification

Keywords: Oocytes, vitrification, survival, *hemistraw*, *cryotop*

2017 Agripet : Vol (17) No. 2 : 75-80

PENDAHULUAN

Transfer Embrio (TE) merupakan salah satu inovasi bioteknologi reproduksi yang rutin

dilakukan di bidang peternakan. Teknologi ini meliputi serangkaian proses yang cukup kompleks yaitu: superovulasi betina, sinkronisasi estrus, produksi embrio secara *in vivo* maupun secara *in vitro* dan proses TE. Produksi embrio secara *in vitro* akan lebih

Corresponding author : widyastuti25@gmail.com
DOI : <https://doi.org/10.17969/agripet.v17i2.8131>

efektif, fleksibel dan bermanfaat apabila dapat memanfaatkan oosit beku (*frozen oocyte*) yang 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).

Pengawetan/simpan beku oosit masih jarang dilakukan disebabkan oleh masih rendahnya angka hidup oosit setelah proses simpan-beku. Proses simpan-beku oosit sangat potensial untuk dijadikan sebagai *bank* genetik dan digunakan sebagai sumber produksi embrio secara *in vitro*. Saat ini, terdapat dua metoda yang digunakan dalam proses simpan-beku sel telur yaitu *slow freezing* dan vitrifikasi. *Slow freezing* membutuhkan alat pembekuan yang mahal dan waktu yang lama untuk pembekuan. Oleh karena itu, saat ini, banyak penelitian yang beralih ke proses vitrifikasi karena tidak membutuhkan alat yang mahal dan dapat dilakukan dalam waktu yang lebih singkat. Proses simpan-beku oosit dengan vitrifikasi memerlukan alat yang jauh lebih sederhana dan murah dibanding *slow freezing* karena tidak membutuhkan mesin pemrogram yang berharga ratusan juta rupiah (Liebermann *et al.*, 2002).

Kunci utama yang menentukan tingkat keberhasilan vitrifikasi oosit adalah keseimbangan antara laju pendinginan, konsentrasi dan jenis krioprotektan yang digunakan. Salah satu upaya untuk menyeimbangkan laju pendinginan adalah dengan menggunakan *carrier* yang mampu memperkecil volume krioprotektan yang digunakan. Beberapa jenis *carrier* yang telah digunakan untuk vitrifikasi oosit adalah *cryoloop*, *cryotop*, *fibreplug*, *electron microscop grid*, dan lain-lain (Bartolac *et al.*, 2015)

Cryotop digunakan sebagai *carrier* untuk vitrifikasi maupun *slow freezing* (pembekuan lambat) baik pada oosit maupun pada embrio (Lin *et al.*, 2010). *Cryotop* kit merupakan *carrier* dengan sistem tertutup sehingga mampu melindungi secara optimal dari kontaminasi maupun kerusakan secara fisik. Bentuk *cryotop* sangat sederhana dan mudah digunakan sehingga sangat efisien,

namun demikian harganya relatif mahal sekitar Rp. 300.000 per buah. *Hemi-straw* dibuat secara *home-made* dengan memotong ujung *straw* sehingga lebih efektif efisien dan sangat ekonomis (Marco-Jiménez *et al.*, 2016). *Hemistraw* dapat digunakan untuk menampung oosit dan krioprotektan pada ujungnya. Kedua sistem *carrier* tersebut telah digunakan untuk vitrifikasi oosit dan berbagai tahap perkembangan embrio pada manusia (Elnahas *et al.*, 2010)

Berdasarkan uraian tersebut, akan dilihat apakah dengan adanya perbedaan volume dari krioprotektan yang di vitrifikasi akan didapat hasil yang berbeda dari tingkat viabilitas oosit setelah proses *warming* (dicairkan kembali). Tujuan dari penelitian ini adalah melihat persentase hidup (viabilitas) oosit yang divitrifikasi dengan menggunakan sistem *carrier cryolop* dan *hemistraw* pasca vitrifikasi.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan oosit domba lokal yang diperoleh dari ovarium domba lokal yang dipotong di tempat pembedahan hewan (TPH) setempat, NaCl fisiologis 0,9%, *fetal bovine serum* (FBS), *tissue culture media* 199 (TCM 199), *follicle stimulating hormone* (FSH), *luteinizing hormone* (LH), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glikol (EG), sukrosa, Na Bicarbonat, *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Vitrifikasi menggunakan alat *cryotop* (komersial) dan *hemistraw* (*home made*) serta mikroskop stereo dan *inverted* untuk koleksi dan evaluasi oosit.

Media Yang Digunakan

Media maturase oosit yang digunakan adalah media TCM199 (Sigma, USA) yang ditambahkan FBS 10%, 10 IU/ml *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (Intergonan, Intervet Deutschland GmbH), 10 IU/ml *human chorionic gonadotrophin* (hCG) (Chorulon, Intervet international B.V. Boxmeer-Holland) dan 50 µg/ml *gentamycin* (Sigma, USA). Media yang digunakan untuk equilibrasi oosit adalah 8,5% v/v DMSO + 8,5% v/v EG dalam media dasar PBS yang

telah ditambahkan dengan FBS 20%. Media vitrifikasi yang digunakan adalah 17% v/v DMSO + 17% v/v EG + 0.65 M sukrosa dalam media dasar PBS yang telah ditambahkan dengan FBS 20%.

Metode Pengambilan Sampel Koleksi Ovarium dan Koleksi Oosit

Oosit domba diperoleh dari ovarium domba yang dipotong di TPH. Ovarium dicuci dengan media koleksi, oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dan dicuci 3 kali, pencucian terakhir dengan media maturasi TCM 199. Oosit yang mempunyai sel-sel kumulus kompleks lebih dari dua lapis dengan sitoplasma homogen yang digunakan sebagai objek penelitian.

Proses Maturasi Oosit

Proses maturasi oosit yang digunakan pada penelitian ini adalah sesuai dengan metode yang digunakan oleh Widyastuti dan Rasad (2015). Oosit yang diperoleh dimaturasi secara *in vitro* dengan menggunakan media maturasi selama 24 jam. Oosit dicuci sebanyak 3 kali dengan media dPBS kemudian oosit dipindahkan ke dalam 100 μ L *drop* media pematangan yang dibuat pada *petridish* steril lalu ditutup dengan mineral oil. Setiap *drop* media pematangan berisi sekitar yaitu 10 oosit. Selanjutnya oosit diinkubasi selama 24-26 jam dalam inkubator pada suhu 38,5°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%. Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap kematangan oosit. Tingkat kematangan oosit dievaluasi dengan melihat munculnya polar body pertama. Selanjutnya dilakukan vitrifikasi pada oosit yang telah matang.

Metode Vitrifikasi dan Warming (pencairan) Oosit

Proses Vitrifikasi (Simpan Beku)

Oosit yang telah matang dibagi menjadi 2 kelompok. (i) divitrifikasi dengan menggunakan *carrier cryotop* (ii) divitrifikasi dengan menggunakan *carrier hemistraw* (*home-made*). Oosit diekuilibrasikan selama 15 menit di dalam larutan ekuilibrasikan, kemudian dipaparkan ke dalam medium vitrifikasi selama 30 detik. Selanjutnya oosit dari kelompok I di

loading ke dalam *cryotop* dan kelompok (ii) di *loading* ke dalam *hemistraw*. Alat ini kemudian dipaparkan secara langsung ke dalam *liquid nitrogen* (LN₂) dan kemudian disimpan di dalam tanki LN₂ sebelum dilakukan *warming* kembali. Semua proses vitrifikasi tersebut dilakukan di suhu ruang.

Proses Warming Oosit

Oosit dicairkan kembali dengan cara memasukkan *carrier* (*cryotop* dan *hemistraw*) ke dalam media pencairan dengan 3 pencairan yang berbeda; 0.5 M sukrosa, 0.25 M sukrosa dan 0.15 M sukrosa. Setelah *warming*, oosit dikultur dalam incubator CO₂ selama 3-4 jam untuk melihat apakah oosit hidup (viabilitas) atau mati (lisis).

Evaluasi Viabilitas Oosit

Evaluasi viabilitas oosit domba setelah vitrifikasi dilakukan dengan mengkultur secara *in vitro* pada media kultur selama 3 jam untuk melihat re-ekspansi sel-sel, keutuhan sitoplasma, dan kondisi zona pelusida oosit.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Perlakuan yang dicobakan adalah vitrifikasi oosit domba dengan menggunakan *carrier cryotop* dan *hemistraw* (*home made*). Parameter yang diamati adalah persentase viabilitas oosit setelah vitrifikasi-*warming*. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan software SPSS versi 16 *Chi-Square*. Viabilitas oosit setelah vitrifikasi dianalisa dengan menggunakan Student's t-test dengan tingkat signifikan $p < 0.05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prinsip dasar vitrifikasi adalah pemadatan larutan pada suhu yang sangat rendah tanpa disertai pembentukan kristal es intra maupun ekstraselular dengan cara meningkatkan viskositas larutan dan meningkatkan laju pembekuan yaitu 15.000-240.000°C per menit dengan waktu pembekuan yang cepat (<60 detik) (Vajta *et al.*, 1998). Secara teoritis, laju kecepatan pembekuan dan

warming yang tinggi akan tercapai apabila digunakan *carrier* vitrifikasi yang mampu menampung larutan vitrifikasi dengan volume sekecil mungkin dan mampu memfasilitasi kontak secara langsung larutan vitrifikasi dengan nitrogen cair. Hasil observasi persentase oosit hidup pasca vitrifikasi *warming* dengan menggunakan *carrier cryotop* dan *hemistraw* dapat diamati pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase oosit hidup pasca vitrifikasi -*warming* pada sistem *carrier* yang berbeda

Sistem <i>Carrier</i>	Jumlah oosit (n)	Persentase oosit hidup pasca vitrifikasi <i>Warming</i> (%)
<i>Hemistraw</i>	32	24 (75,67 ± 7,60% ^a)
<i>Cryotop</i>	33	26 (75,86 ± 11,86% ^a)

Keterangan: *Superskrip* yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata pada persentase oosit hidup pasca vitrifikasi-*warming* antara oosit yang dibekukan dengan menggunakan *cryotop* dengan oosit yang dibekukan dengan menggunakan *hemistraw* (P<0,05). Kondisi ini disebabkan karena dua jenis *carrier* ini merupakan sistem terbuka sehingga memungkinkan oosit dan media langsung kontak dengan nitrogen cair. Selain itu, volume krioprotektan yang digunakan pada kedua *carrier* tersebut sangat kecil (<3 µl). Kondisi demikian menyebabkan oosit dan media dapat mencapai suhu pembekuan dengan sangat cepat dan rendah sehingga dapat meminimalisir terjadinya *chilling injury* (kerusakan pada sel akibat suhu dingin). *Chilling injury* terjadi karena proses pembekuan yang berjalan lambat, terjadi pada titik kritis di suhu 15°C. Pada kondisi tersebut, sel akan mulai mengalami kerusakan seperti hancurnya mitokondria, sel lemak, dan sitoplasma serta memacu abnormalitas dari kromosom (Boiso *et al.*, 2002; Albarracin, *et al.*, 2005; Gautam *et al.*, 2008).

Keuntungan lain dari penggunaan volume krioprotektan yang kecil adalah dapat mencegah terbentuknya kristal es (Rall and Wood, 1994). Selain itu, pada saat *warming*, volume krioprotektan yang sangat kecil akan memudahkan pada saat *expel* dan kontak dengan media *warming* sehingga akan mengurangi efek toksik dan perubahan tekanan

osmotik yang drastis. Hal ini secara otomatis akan meningkatkan persentase oosit hidup pasca vitrifikasi. Perubahan tekanan osmotik mempunyai pengaruh yang sangat kuat terhadap kemampuan hidup oosit. Perubahan osmotik yang cukup drastis, akan memicu timbulnya stres osmotik yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada oosit selama proses vitrifikasi. Kerusakan dapat terjadi karena interaksi beberapa faktor pada setiap tahapan proses vitrifikasi, diantaranya adalah pada saat oosit dipaparkan ke dalam larutan vitrifikasi yang mengandung krioprotektan yang tinggi konsentrasinya, saat pemaparan ke dalam nitrogen cair dan pada saat proses pencairan kembali/ *warming* (O'Neil *et al.*, 1997).

Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa penggunaan *hemistraw* dapat meningkatkan persentase hidup oosit dan blastosis pasca vitrifikasi apabila dibandingkan dengan penggunaan *straw* konvensional (Vanderzwalmen *et al.*, 2002). Ujung *hemistraw* dan *cryotop* yang tipis dan langsung kontak dengan permukaan nitrogen cair akan mengurangi efek *thermoinsulating* sehingga membantu perpindahan kalor menjadi lebih cepat (Abdelhafez *et al.*, 2011). Kondisi ini, tentunya akan meningkatkan persentase hidup oosit pasca vitrifikasi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vitrifikasi oosit dengan menggunakan metode *Cryotop* dan *hemistraw* sebagai sistem *carrier* belum mampu meningkatkan persentase oosit hidup domba.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada DRPM UNPAD yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Peningkatan Kapasitas Riset Dosen Universitas Padjadjaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhafez, F., Xu, J., Goldberg, J., Desai, N., 2011. Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: Assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnology*. 11 (29): <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/29>
- Albarracín, J.L., Morató, R., Izquierdo, D., Mogas, T., 2005. Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. *Mol Reprod Dev*. 72: 239-249.
- Bartolac, L.M., Lowe, J.L., Koustas, G., Sjoblom, C., Grupen, C.G., 2015. A comparison of different vitrification device and the effect of blastocoeal collapse on the cryosurvival of in vitro produced porcine embryos. *J Reprod Dev*. 61(6): 525-531.
- Boiso, I., Marti, M., Santalo, J., Ponsa, M., Barri, P.N., Veiga, A., 2002. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod*. 17: 1885-1891.
- Celestino, J.J., dos Santos, R.R., Lopes, C.A., Martins, F.S., Matos, M.H., Melo, M.A., 2008. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultrastructure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim. Reprod. Sci*. 108(3-4):309-318.
- Cobo, A., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., 2010. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod*. 25:2239-2246.
- Elnahas, A., Alcolak, E., Marar, E.A., Elnahas, T., Elnahas, K., Palapelas, v., Diedrich, K., Al-Hasani, S., 2010. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Society Journal*. 15: 2-9.
- Gautam, S.K., Verma, V., Palta, P., Chauhan, M.S., Manik, R.S., 2008. Effect of type of cryoprotectant on morphology and developmental competence of in vitro-matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes subjected to slow freezing or vitrification. *Reprod Fertil Dev*. 20: 490-496.
- Lieberman, J., Nawroth, F., Isachenko, E., Rahimi, G., Tucker, M.J., 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod*. 67(6): 1671-1680.
- Lin, T.K., Su, J.T., Lee, F.K., Lin, Y.R., Lo, H.C., 2010. Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: survival and outcomes. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 49(3): 272-8.
- Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Almela-Miralles, V., Vicente, J.S., 2016. Development of cheaper embryo vitrification device using the minimum volume method. *Plos One*. 11(2): e0148661.
- O'Neil, L., Paynter, S.J., Fuller, B.J. Shaw, R.W., 1997. Murine oocyte cytoskeletal changes, fertilization and embryonic development following exposure to a vitrification solution. *Cryo-Lett*. 18:17-26.
- Rall, W.F., and Wood, M.J., 1994. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *Journal of Reprod Fertil*. 101: 681-688.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H., 1998. open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 51: 53-58.

- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C.H., Standaert, V., Van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K. and Schoysman, R., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum. Reprod.* 17: 744-751.
- Wahjuningsih, S., Hardjopranjoto, S., Sumitro, S.B., 2010. Pengaruh konsentrasi etilen glikol dan lama paparan terhadap tingkat fertilitas in vitro oosit sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan.* 4(2): 61-64.
- Widyastuti, R., dan Rasad, S.D., 2015. Tingkat kematangan inti oosit sapi setelah 24 jam presevasi ovarium. *Agripet* 15 (2): 72-78.