

PEMANFAATAN METODE VITRIFIKASI UNTUK KRIOPRESERVASI OOSIT MAMALIA

FITRA AJI PAMUNGKAS

Loka Penelitian Kambing Potong, Sei Putih, PO Box I, Galang 20585, Sumatera Utara

(Makalah diterima 30 April 2010 – Revisi 19 Agustus 2010)

ABSTRAK

Teknik kriopreservasi oosit merupakan suatu cara untuk menyimpan oosit dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin dan mempertahankan kelangsungan hidup sel. Vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang semakin populer dalam bidang reproduksi dan masih sulit dilakukan karena ukuran, bentuk dan jumlah sel oosit, disamping kejutan osmotik dan fraktur. Upaya perbaikan metode dan teknik vitrifikasi mencakup konsep pengurangan konsentrasi dari krioprotektan, peningkatan tingkat pendinginan dan pengenceran kembali, pemulihan meiosis spindle, dan waktu fertilisasi. Larutan vitrifikasi yang terdiri dari 15% (v/v) etilen glikol, 15% (v/v) dimethylsulfoxide atau 1,2-propanediol, dan 0,5 mol/L sukrosa mempunyai kadar toksik rendah dan dapat digunakan untuk vitrifikasi. Pada vitrifikasi, *pretreatment* dilakukan pada temperatur 37°C selama 2 – 3 menit dengan waktu pemaparan 20 – 30 detik. Sedangkan pada suhu kamar, *pretreatment* dilakukan 5 – 15 menit dengan waktu pemaparan 30 – 60 detik. Proses pengenceran kembali dapat dilakukan dengan perendaman langsung *straw* ke dalam air dengan penempatan *straw* di udara selama 5 detik sebelum perendaman atau pada temperatur 37°C. Sedangkan waktu fertilisasi dilakukan pada 2 – 3 jam setelah *thawing* dan inkubasi untuk memberikan waktu bagi oosit melakukan pemulihan *spindle* yang berperan penting dalam kesuksesan program kriopreservasi oosit.

Kata kunci: Kriopreservasi, vitrifikasi, oosit

ABSTRACT

THE USE OF VITRIFICATION METHOD FOR CRYOPRESERVATION OF MAMMALIAN OOCYTE

Technique cryopreservation of oocyte is a way to storage, maintenance, and guarantee the survival of frozen cells. Vittrification is a cryopreservation method which is increasingly popular in reproduction but it is still difficult to be done because of the size, shape, and numbers of oocytes, as well as osmotic shock and fractures. The efforts to improve the method and technique vittrification are by reducing the concentration of cryoprotectants, increasing the cooling rate and warming, recovery of meiotic spindles, and the time of fertilization. Vittrification solution consist of 15% (v/v) ethylene glycol, 15% (v/v) dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol, and 0.5 mol/L sucrose was less toxic. Therefore, at 37°C, 2 – 3 minutes are usually used for the pretreatment solution and 20 – 30 seconds for exposure to the vittrification solution. In contrast, at room temperature, 5 – 15 minutes are commonly used for pretreatment and 30 – 60 seconds for exposure to the vittrification solution. Warming procedure is performed by direct immersion of the straw into a water bath. Holding the straw in air for 5 seconds before immersion can avoid bursting or performed warming and dilution at 37°C. While the time of fertilization performed at 2 – 3 hours after thawing and incubation for oocyte spindle to recover which is essential for the successful of oocyte cryopreservation program.

Key words: Cryopreservation, vittrification, oocyte

PENDAHULUAN

Kriopreservasi oosit merupakan salah satu cara untuk meningkatkan nilai tambah oosit sehingga dapat dipergunakan tanpa dibatasi oleh kendala waktu dan jarak. Teknik kriopreservasi oosit merupakan suatu cara untuk menyimpan sampel dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin dan mempertahankan kelangsungan hidup sel (DJUWITA, 2001). Aplikasi kriopreservasi dalam bidang peternakan termasuk pelestarian *strain* dengan nilai genetik tinggi, rekayasa genetik maupun spesies yang

terancam punah sehingga mengurangi biaya peternakan, menghindari masalah genetik dan wabah penyakit (DAY dan STACEY, 2007). Disamping itu, kemajuan dalam teknologi reproduksi sebagai teknik perbantuan meliputi penggunaan teknik *in vitro* (sarana yang menggabungkan sperma dan oosit untuk fertilisasi serta perkembangan awal embrio), *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), kloning dan produksi ternak transgenik telah membuat peranan kriopreservasi oosit sangat penting (BEARDEN, 2004).

Beberapa prinsip dasar dalam kriopreservasi agar mampu mempertahankan kelangsungan hidup oosit

selama penyimpanan yaitu menghindari pembentukan kristal es, efek toksik dari konsentrasi larutan pada protein *intraseluler*, dan terjadinya kejutan osmotik (*osmotic shock*). Oleh karena itu, strategi yang efektif dalam kriopreservasi bukan saja dengan merendam oosit ke dalam nitrogen cair tetapi juga penambahan bahan kimia berupa krioprotektan yang dapat menghindari kerusakan sel (JAIN dan PAULSON, 2006).

Proses kriopreservasi oosit pada mamalia sampai saat ini dilakukan dengan dua cara yang berbeda yaitu pembekuan lambat (*slow rate freezing*) dan vitrifikasi (*rapid freezing*). *Slow rate freezing* merupakan cara penyimpanan oosit dalam keadaan beku pada temperatur rendah dengan meminimalkan pembentukan kristal es intraselular, sedangkan vitrifikasi tanpa adanya pembentukan kristal es sebagai penyebab utama kerusakan intraselular saat pembekuan sehingga merupakan prosedur alternatif untuk pelestarian oosit (LIEBERMANN *et al.*, 2002).

Vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang semakin populer dalam bidang reproduksi untuk memecahkan berbagai masalah biologis baik dasar maupun terapan melalui proses kriopreservasi yang lebih sederhana daripada metode pembekuan konvensional. Secara umum proses vitrifikasi meliputi: 1) *dehidrasi* yaitu proses dimana terjadi pengeluaran cairan sitoplasma yang digantikan oleh larutan krioprotektan melalui proses difusi ke dalam sel, 2) *cooling* yaitu tahap dimana oosit dan larutan berbeda dalam nitrogen cair membentuk *solid glass*, 3) *warming* yaitu tahap dimana terjadi perubahan kembali bentuk larutan menjadi cair, serta 4) *rehidrasi* yaitu proses dimana masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan (JAIN dan PAULSON, 2006).

KEKURANGAN DAN MANFAAT METODE VITRIFIKASI

Semua metode kriopreservasi terutama pada oosit cenderung mengekspose oosit dengan suatu kondisi lingkungan yang tidak normal sehingga oosit tidak mempunyai kapasitas untuk bertahan hidup. Dengan metode vitrifikasi berusaha untuk membentuk kondisi lingkungan alami yang didukung oleh kapasitas defensif-regeneratif. Namun masalah utama yang paling penting diketahui adalah kerusakan yang terjadi selama pendinginan pada suhu rendah, termasuk kejutan dingin, pembentukan kristal es dan kerusakan fraktur.

Proses pendinginan. Proses pendinginan yang terjadi pada temperatur di bawah -5°C , menyebabkan perubahan struktur membran dan mikrotubuli dari *spindle mitosis* atau *meiosis* dan kerusakan sitoplasma. Oosit dan embrio dari spesies yang berbeda memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap kejutan

dingin. Sampai saat ini, masih sangat terbatas kemungkinan untuk menghindari efek dari kejutan dingin termasuk kerusakan sitoplasma akibat temperatur pada zona kritis dari pendinginan (ESAKI *et al.*, 2004).

Pembentukan kristal es. Pembentukan kristal es baik pada media di sekitar sel, di dalam sitoplasma maupun inti kemungkinan terjadi antara -5 dan -80°C merupakan sumber utama kerusakan oosit. Strategi yang ditempuh baik penggunaan media krioprotektan dan pengontrolan laju perubahan temperatur merupakan hal penting untuk meminimalkan efek tersebut. Namun tidak ada satu pun krioprotektan yang tidak berbahaya, penggunaan krioprotektan memiliki efek racun yang cukup besar dan dapat menyebabkan kerusakan osmotik. Toksisitas dan efek osmotik biasanya sebanding dengan konsentrasi dari substansi maupun waktu pemaparan dan dapat dikurangi dengan penurunan temperatur.

Kerusakan fraktur. Kerusakan fraktur terutama pada objek biologi yang relatif besar seperti oosit dapat terjadi antara -50 dan -150°C dikarenakan pengaruh mekanik dari oosit dan medium vitrifikasi. Jenis kerusakan lebih sering terjadi selama proses pencairan kembali (*warming*) dan mungkin dapat diminimalkan dengan mengurangi tingkat perubahan temperatur pada zona temperatur tersebut (SMITH *et al.*, 2004).

Pengurangan pembentukan kristal es. Manfaat vitrifikasi yang paling penting adalah pengurangan sumber utama kerusakan pada kriopreservasi berupa pembentukan kristal es melalui peningkatan secara radikal baik laju pendinginan dan konsentrasi dari krioprotektan pada medium vitrifikasi. Semakin tinggi laju pendinginan semakin rendah konsentrasi krioprotektan yang diperlukan, begitu pula sebaliknya. Pendekatan untuk menjaga agar toksisitas dan kerusakan osmotik rendah, antara lain: 1) penerapan krioprotektan dengan toksisitas rendah dan permeabilitas tinggi; 2) penggunaan dua atau lebih krioprotektan untuk mengurangi toksisitas spesifik masing-masing; 3) penggunaan krioprotektan yang permeabel dan non-permeabel dalam bentuk campuran; 4) penambahan krioprotektan secara bertahap; 5) peningkatan konsentrasi dari larutan dan pengurangan temperatur saat vitrifikasi (SZELL dan SHELTON, 1994).

Penurunan kejutan dingin. Manfaat lain dari vitrifikasi adalah mengurangi penurunan secara dramatis dari kejutan dingin. Berbeda dengan pembekuan lambat (*slow rate freezing*), sampel vitrifikasi melewati zona temperatur yang berbahaya dengan sangat cepat dan waktu pemaparan yang sangat pendek pada temperatur yang berbahaya (15 sampai -5°C) sehingga dapat mengurangi kerusakan struktur yang sensitif. CUELLO *et al.* (2004) melaporkan bahwa vitrifikasi merupakan salah satu strategi yang hanya

berhasil saat ini untuk kriopreservasi embrio babi utuh yang mengandung kadar lemak sangat tinggi.

KENDALA KRIOPRESERVASI OOSIT MENGUNAKAN VITRIFIKASI

Ada beberapa kendala dalam melakukan kriopreservasi pada oosit antara lain ukuran, bentuk, dan jumlah sel. Dalam bidang kriobiologi, ukuran atau lebih tepatnya massa merupakan faktor yang menentukan. Suspensi kultur dari sel somatik dapat di kriopreservasi dengan efisiensi tinggi dan media sederhana, berbeda halnya pada oosit. Selain dari ukuran, bentuk oosit memperlambat pembentukan distribusi setiap substansi, termasuk permeabilitas krioprotektan yang datang dari luar atau dibebaskan dari oosit, sehingga menyebabkan kerusakan pada oosit. Faktor lain yang berkontribusi terhadap sensitivitas oosit diantaranya temperatur yang relatif tinggi mendorong kerusakan sitoplasma, membran sel dan mikrotubul. Membran sel sangat sensitif dan cepat mengalami transisi dari keadaan cair ke keadaan gel menyebabkan gangguan pada perkembangan sel selanjutnya (GHETLER *et al.*, 2005).

Fenomena yang belum sepenuhnya dipahami adalah perubahan sensitivitas oosit hasil kriopreservasi selama proses pematangan. Walaupun hanya ada sedikit perbedaan antara ukuran dan bentuk, oosit yang belum matang (*immature*) biasanya lebih sensitif terhadap kriopreservasi dibandingkan dengan oosit yang *mature* (tahap metafase II) dikarenakan sensitivitas dari *meiotic spindle* pada saat pendinginan (MEN *et al.*, 2002).

Kejut osmotik pada saat ekuilibriasi menyebabkan penyusutan oosit dan diduga merusak sitoskeleton, pecahnya membran, terjadinya lisis dan kematian oosit. Namun efek dari agen lain misalnya zona *pellucida* menyebabkan perombakan kembali oosit yang diikuti pemulihan secara cepat agar kompeten untuk perkembangan selanjutnya. Pengerasan pada zona *pellucida* yang disebabkan oleh pelepasan granula kortikal yang *premature* dapat menyebabkan penurunan tingkat fertilisasi (STACHECKI dan COHEN, 2004). Selain itu, kerusakan fraktur merupakan konsekuensi umum dari semua prosedur kriopreservasi dan lebih sering terjadi pada oosit dibandingkan embrio. Konsekuensi zona fraktur hampir sama tetapi embrio dapat bertahan hidup dari beberapa tingkat kerusakan membran sel, sedangkan untuk oosit dapat berakibat fatal (KASAI *et al.*, 1996).

USAHA MENGURANGI KENDALA DALAM KRIOPRESERVASI OOSIT

Prinsip yang menunjang keberhasilan proses kriopreservasi yaitu suatu metode yang meminimalkan

kejutan dingin. Dalam oosit dan embrio mamalia, dua pendekatan yang telah sukses digunakan untuk tujuan tersebut yaitu: 1) pemindahan tetesan lipida dengan kecepatan tinggi sentrifugasi dan mikromani pulasi, dan 2) peningkatan secara radikal tingkat pendinginan dan pemanasan untuk meminimalkan lama pemaparan sampai temperatur yang berbahaya (ESAKI *et al.*, 2004).

Oosit dengan massa yang besar dan bentuk sel bulat memerlukan penggunaan krioprotektan yang permeabel dengan toksisitas rendah diantaranya etilen glikol. Untuk memfasilitasi dehidrasi dan mengurangi kemungkinan pembentukan es intraselular, penambahan krioprotektan non-permeabel juga diperlukan. Bahan kimia yang termasuk polimer dengan toksisitas rendah yang bisa digunakan yaitu sukrosa atau trehalose.

Dalam beberapa tahun terakhir, pada dasarnya ada strategi ekuilibriasi sebelum pendinginan diterapkan. MARTINO *et al.* (1996) menyarankan agar dehidrasi bahkan mungkin lebih penting dari konsentrasi krioprotektan untuk mencegah pembentukan kristal es dan waktu ekuilibriasi yang sangat singkat untuk konsentrasi larutan krioprotektan. Namun pendekatan lain yang lebih efisien yaitu ekuilibriasi yang diperpanjang dalam larutan krioprotektan non-permeabel dapat menjamin penetrasi krioprotektan untuk memberikan perlindungan yang tepat ke seluruh oosit (PAPIS *et al.*, 2000).

Pendekatan lain untuk meminimalkan efek toksik dan osmotik dari krioprotektan adalah mengurangi konsentrasi yang diperlukan untuk mempertahankan pola pada saat terbentuknya kristal es. Salah satu cara praktis yaitu dengan meningkatkan tingkat pendinginan yang ekstrim. Berbagai alat yang digunakan untuk penerapan tujuan ini adalah *electron microscopic grid*, *Cryoloops*, dan tampaknya *Cryotops* yang paling tepat, walaupun baru-baru ini hasil yang sama telah dicapai dengan menggunakan teknik *Open pulled straw* (SELMAN *et al.*, 2006).

Kerusakan fraktur tidak spesifik pada kriopreservasi oosit tetapi konsekuensi mungkin lebih merugikan dalam oosit, sehingga sistem vitrifikasi yang terbuka dapat mengurangi terjadinya kerusakan ini. Dalam sistem tertutup, perubahan tekanan yang ekstrim disebabkan oleh pendinginan atau pemanasan gelembung udara yang cepat dapat menyebabkan dislokasi pada zona *pellucida* atau membran sel. Sedangkan pada sistem terbuka, sedikitnya volume yang digunakan dapat meminimalkan kemungkinan fraktur. Sedangkan permasalahan mengenai terjadinya pengerasan zona dan rendahnya tingkat pembuahan pada proses selanjutnya dapat diminimalkan dengan penggunaan aplikasi *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Penerapan ICSI setelah kriopreservasi dapat meningkatkan efisiensi dan memberikan peluang untuk aplikasi kriopreservasi oosit secara luas.

BEBERAPA PROSEDUR DALAM VITRIFIKASI OOSIT

Perbaikan vitrifikasi akhir-akhir ini mencakup konsep pengurangan konsentrasi dari krioprotektan, peningkatan tingkat pendinginan (*cooling*) dan pencairan kembali (*warming*) serta pemulihan *meiotic spindle* dan waktu fertilisasi.

Reduksi konsentrasi dan toksisitas larutan vitrifikasi

Larutan vitrifikasi dengan bahan dasar etilen glikol (EG) banyak digunakan untuk kriopreservasi praimplantasi semua tahapan *in vivo*. Tidak terjadi penurunan yang signifikan dari viabilitas baik *in vitro* maupun *in vivo*. Akhir-akhir ini, konsentrasi larutan vitrifikasi telah lebih jauh berkurang karena metode penurunan volume dengan peningkatan tingkat pendinginan dan pemanasan dengan konsentrasi krioprotektan yang minimum (Tabel 1). Larutan

vitrifikasi yang terdiri dari 15% (v/v) EG, 15% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) atau 1,2-propanediol (PROH), dan 0,5 mol/L sukrosa dapat digunakan untuk vitrifikasi dengan metode volume yang minimum (CHIAN *et al.*, 2005).

EG merupakan komponen penting dalam larutan vitrifikasi karena mempunyai karakteristik toksisitas rendah dan permeasi yang cepat terhadap sel. Beberapa penelitian menggunakan kombinasi dengan krioprotektan lain seperti DMSO atau PROH untuk mengurangi konsentrasi dari satu krioprotektan dalam rangka mengurangi toksisitas tertentu terhadap oosit. Krioprotektan yang non-permeabel dapat memfasilitasi dehidrasi dan vitrifikasi sehingga dapat juga diterapkan dalam kombinasi larutan vitrifikasi. Sukrosa telah menjadi komponen standar dalam larutan vitrifikasi, selain itu penambahan makromolekul lain seperti Ficoll dapat menstabilkan pembentukan kristal es dengan membentuk lapisan pelindung di sekitar oosit (MUKAIDA *et al.*, 2003).

Tabel 1. Berbagai contoh dari krioprotektan, waktu pemaparan, dan suhu dalam proses vitrifikasi

| Larutan ekuilibrasi | Larutan vitrifikasi | Warming dan larutan yang digunakan | Metode pengemasan | Materi | Penulis |
|--|--|--|-------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 7,5% EG, 7,5% DMSO, 3 menit, 34 – 36°C | 16,5% EG, 16,5% DMSO, 0,5 mol/l sukrosa, 25 detik, 34 – 36°C | 0,25; 0,15 mol/l sukrosa, 37°C | OPS | Oosit dan embryo sapi | VATJA <i>et al.</i> (1998) |
| 1,5 mol/l EG, 5 menit, RT | 5,5 mol/l EG, 1,0 mol/l sukrosa, 60 detik, RT | 0,5; 0,25; 0,125 mol/l sukrosa, RT | Straw | Oosit manusia | CHEN <i>et al.</i> (2000) |
| 1,5 mol/l EG, 2,5 menit, 37°C | 5,5 mol/l EG, 1,0 mol/l sukrosa, 20 detik, 37°C | 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 mol/l sukrosa, RT | Grid | Oosit manusia | YOON <i>et al.</i> (2003) |
| 7,5% EG, 7,5% DMSO, 2 menit, 37°C | 15% EG, 15% DMSO, 10 mg/ml Ficoll, 0,65 mol/l sukrosa, 25 – 30 detik, 37°C | 0,33; 0,2 mol/l sukrosa, 37°C | Cryoloop | Blastosit manusia | MUKAIDA <i>et al.</i> (2003) |
| 1,6 mol/l EG, 5 – 15 menit, 22°C | 5 mol/l EG, 1 mol/l sukrosa, 30 detik, 22°C | 1,0; 0,5 mol/l sukrosa, 37°C | Cryotop | Oosit manusia | KUWAYAMA <i>et al.</i> (2005) |
| 7,5% EG, 7,5% PROH, 5 menit, RT | 15% EG, 15% PROH, 0,5 mol/l sukrosa, 45 – 60 detik, RT | 1,0; 0,5; 0,25 mol/l sukrosa, 37°C | Cryoleaf | Oosit manusia | CHIAN <i>et al.</i> (2005) |
| 40% propanediol, 0,25 mol/l trehalose, 4% BSA, 10 menit, 20 – 25°C | 40% propanediol, 0,25 mol/l trehalose, 4% BSA, 20 – 25°C | Air 37°C, 40 detik | Straw | Oosit kambing | KHARCHE <i>et al.</i> (2005) |
| TCM, 20% FCS, 0,54 M EG, 5µg/ml cytochalasin, 15 menit | TCM, 20% FCS, 30% EG, 5µg/ml cytochalasin, 25 detik, RT | TCM, 20% FCS, 0,2 mM Na-pyruvate, 50 µg gentamisin, 5menit, 30°C | OPS | Oosit sapi | MAGNUSSON <i>et al.</i> (2008) |
| 4% EG, 12 – 15 menit, 38,5°C | 35% EG, 50 mg/ml polyvinyl pyrrolidone, 0,4 M trehalose, 30 detik, 38,5°C | 0,3 M trehalose, 38,5°C | Cryotop | Oosit sapi | SRIPUNYA <i>et al.</i> (2010) |

RT: suhu ruangan; EG: Etilen glikol; PROH: 1,2-propanediol; DMSO: Dimethylsulfoxide; FCS: Fetal calf serum; TCM: Tissue culture media; OPS: Open pulled straw

Ekuilibrasi dan vitrifikasi

Strategi lain yang penting untuk mengurangi efek toksik dari larutan vitrifikasi adalah ekuilibrasi dari krioprotektan. Larutan ekuilibrasi *pretreatment* mengandung 20 – 50% konsentrasi krioprotektan yang berasal dari larutan vitrifikasi. Konsentrasi yang rendah dari krioprotektan pada larutan ekuilibrasi dapat mengurangi efek toksik dari larutan vitrifikasi. Oosit dalam larutan *pretreatment* secara bertahap menyusut kemudian kembali pada volume semula. Hal ini menunjukkan bahwa masuknya krioprotektan ke dalam oosit mungkin dapat memfasilitasi vitrifikasi intraseluler dalam proses berikutnya. Dalam vitrifikasi oosit manusia diperoleh bahwa oosit yang di ekuilibrasi *pretreatment* secara signifikan memiliki daya hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak (CHEN *et al.*, 2000). Vitrifikasi tanpa *pretreatment* kemungkinan dapat mengakibatkan pembentukan kristal es intraseluler selama pendinginan atau pemanasan.

Untuk vitrifikasi oosit, beberapa peneliti melakukan pemaparan krioprotektan pada suhu kamar, tetapi peneliti lain melakukannya pada temperatur 35-37°C. Temperatur yang lebih tinggi meningkatkan penyerapan krioprotektan di dalam membran sel, tetapi dapat meningkatkan toksisitas. Oleh karena itu, biasanya digunakan temperatur 37°C selama 2 – 3 menit untuk *pretreatment*, dan 20 – 30 detik untuk pemaparan ke larutan vitrifikasi (YOON *et al.*, 2003). Sedangkan pada suhu kamar, *pretreatment* biasanya dilakukan 5 – 15 menit dan 30 – 60 detik untuk pemaparan ke larutan vitrifikasi. Penggunaan metode volume minimum dapat mencapai tingkat pendinginan dan pencairan yang lebih tinggi dan mengurangi konsentrasi dari krioprotektan pada saat vitrifikasi. Lamanya pemaparan untuk ekuilibrasi atau vitrifikasi tergantung pada temperatur dan konsentrasi dari krioprotektan.

Pencairan kembali (*warming*)

Vitrifikasi oosit sensitif terhadap perubahan tekanan osmotik setelah *warming*. Larutan yang mengandung buffer osmotik biasanya digunakan untuk mencegah pembengkakan dan lisis yang berlebihan dari oosit ketika pengeluaran krioprotektan selama proses *warming*. Kecepatan dalam proses *warming* sangat penting untuk mencegah devitrifikasi. Pada cara konvensional, pencairan dilakukan dengan perendaman langsung straw ke dalam air. Penempatan straw di udara selama 5 detik sebelum perendaman dapat menghindari kerusakan straw. Beberapa penelitian melakukan proses pencairan kembali (*warming*) pada suhu 37°C seperti terlihat pada Tabel 1. KUWAYAMA *et al.* (2005) melakukan proses *warming* dengan dua

tahap yaitu menggunakan 1,0 mol/l sukrosa selama 1 menit pada suhu 37°C, lalu oosit dipindahkan ke dalam larutan yang mengandung 0,5 mol/l sukrosa selama 3 menit dan kemudian dicuci dua kali dalam media kultur. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa dan proses *warming* pada temperatur 37°C dapat mengurangi kerusakan *meiotic spindle*.

Pemulihan *meiotic spindle* dan waktu fertilisasi

Selama proses vitrifikasi dan *warming* cenderung mengakibatkan kerusakan pada *meiotic spindle* dari oosit. Perubahan dan pemulihan *spindle* berkaitan dengan adanya efek fungsional dari oosit setelah fertilisasi dan tahap perkembangan selanjutnya. EROGLU *et al.* (1998) mengamati bahwa kriopreservasi oosit dengan pembekuan lambat yang diinseminasi segera setelah *warming* menunjukkan penurunan rotasi *spindle*, pembentukan *polar body* II, migrasi pronukleus dan pembentukan *meiotic spindle*. Sedangkan, inseminasi yang dilakukan setelah inkubasi selama 1 jam menunjukkan dinamika fertilisasi yang normal.

Setelah fertilisasi oleh masuknya spermatozoa, kalsium intraseluler akan meningkat dan faktor sitostatik mengalami penurunan. DOZORTSEV *et al.* (2004) menemukan bahwa waktu yang optimal untuk ICSI pada oosit manusia dari 37 – 41 jam setelah pemberian *human chorionic gonadotropin* (hCG). Memilih interval waktu yang optimum antara *warming* dan inseminasi sangatlah penting untuk fertilisasi yang normal dan tahap perkembangan selanjutnya. Oleh karena itu, mempertimbangkan aspek penuaan oosit dan pemulihan *spindle* merupakan faktor penting untuk kesuksesan program kriopreservasi oosit. LUCENA *et al.* (2006) melaporkan bahwa pada oosit manusia yang di vitrifikasi, ICSI biasanya dilakukan pada 2 – 3 jam setelah *warming* dan inkubasi.

KESIMPULAN

Upaya perbaikan metode dan teknik vitrifikasi mencakup konsep pengurangan konsentrasi dari krioprotektan, peningkatan tingkat pendinginan (*cooling*) dan pemanasan (*warming*), pemulihan *meiotic spindle*, dan waktu fertilisasi. Larutan vitrifikasi yang terdiri dari 15% (v/v) EG, 15% (v/v) *dimethylsulfoxide* (DMSO) atau *1,2-propanediol* (PROH), dan 0,5 mol/L sukrosa mempunyai kadar toksik rendah dan dapat digunakan untuk vitrifikasi dengan metode volume yang minimum.

Temperatur yang lebih tinggi meningkatkan penyerapan krioprotektan di dalam membran sel, tetapi dapat meningkatkan toksisitas. Oleh karena itu,

pretreatment dilakukan pada temperatur 37°C selama 2 – 3 menit dengan waktu pemaparan ke larutan vitrifikasi 20 – 30 detik. Sedangkan pada suhu kamar, *pretreatment* biasanya dilakukan 5 – 15 menit dengan waktu pemaparan ke larutan vitrifikasi 30 – 60 detik.

Kecepatan dalam proses pengenceran kembali (*warming*) sangat penting untuk mencegah devitrifikasi, hal ini dapat dilakukan dengan perendaman langsung *straw* ke dalam air dengan penempatan *straw* di udara selama 5 detik sebelum perendaman atau pada suhu 37°C.

Sedangkan, waktu fertilisasi dilakukan pada 2 – 3 jam setelah *thawing* dan inkubasi untuk memberikan waktu bagi oosit melakukan pemulihan *spindle* yang berperan penting dalam kesuksesan program kriopreservasi oosit.

DAFTAR PUSTAKA

- BEARDEN, H.J., J.W. FUQUAY and S.T. WILLARD. 2004. *Applied Animal Reproduction*. Sixth Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hill. 448 p.
- CHEN, S.U., Y.L. LIEN and K.H. CHAO. 2000. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil. Steril.* 74 : 4–8.
- CHIAN, R.C., W.Y. SON and J.Y. HUANG. 2005. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil. Steril.* 84(Suppl 1): S36.
- CUELLO, C., M.A. GIL and I. PARRILA. 2004. In vitro development following one-step dilution of OPS vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 62: 44 – 52.
- DAY, J.G. and G.N. STACEY. 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Second Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey. 347 p.
- DJUWITA, I. 2001. Kajian morfologis dan fungsi biologis oosit domba setelah kriopreservasi dengan metode vitrifikasi. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. 104 hlm.
- DOZORTSEV, D., P. NAGY and S. ABDELMASSIH. 2004. The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 82: 2 – 6.
- EROGLU, A., T.L. TOTH and M. TONER. 1998. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil. Steril.* 69(9): 44 – 57.
- ESAKI, R., H. UEDA and M. KUROME. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 71(43): 2 – 7.
- GHETLER, Y., S. YAVIN and R. SHALGI. 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transitions in human oocytes and zygotes. *Human Reprod.* 20: 3385 – 3389.
- JAIN, J.K. and R.J. PAULSON. 2006. Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 86: 1037 – 1046.
- KASAI, M., S.E. ZHU and P.B. PEDRO. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 33(4): 59 – 64.
- KHARCHE, S.D., G.T. SHARMA and A.C. MAJUMDAR. 2005. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Small Rum. Res.* 57: 81 – 84.
- KUWAYAMA, M., G. VAJTA and O. KATO. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11(30): 1 – 8.
- LIEBERMANN, J., F. NAWROTH and F. ISACHENKO. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 67: 71 – 80.
- LUCENA, E., D.P. BERNAL and C. LUCENA. 2006. Successful on going pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil. Steril.* 85: 8 – 11.
- MAGNUSSON, V., W.B. FEITOSA, M.D. GOISSIS, C. YAMADA, L.M.T. TAVARES, M.E. ORTIZ, D.A. JOSE and A. VISINTIN. 2008. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 265 – 273.
- MARTINO, A., N. SONGSASEN and S.P. LEIBO. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 59 – 69.
- MEN, H., R.L. MONSON and J.J. RUTLEDGE. 2002. Effect of meiotic stage and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology* 57: 1095 – 1103.
- MUKAIDA, T., S. NAKAMURA and T. TUMIYAMA. 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Human. Reprod.* 18(3): 84 – 91.
- PAPIS, K., M. SHIMIZU and Y. IZAIKE. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 54: 1 – 8.
- SELMAN, H., A. ANGELINI, N. BARNOCCHI, G.F. BRUSCO, A. PACCHIAROTTI and C. ARAGONA. 2006. Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.* 86(9): 97 – 100.
- SMITH, G.D., E. SILVA and C.A. SILVA. 2004. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod. Biomed. Online* 9(1) 71 – 78.

- SRIPUNYA, N., T. SOMFAI, Y. INABA, T. NAGAI, K. IMAI and R. PARNPAI. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 56(1): 176 – 181.
- STACHECKI, J. and J. COHEN. 2004. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online* 9(1): 52 – 63.
- SZELL, A. and N.J. SHELTON. 1994. Survival of vitrified sheep embryos *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* 42: 1 – 9.
- VATJA, G., P. HOLM and M. KUWAYAMA. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce croinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51(5): 3 – 8.
- YOON, T.K., T.J. KIM and S.E. PARK. 2003. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.* 79 : 3 – 6.