

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

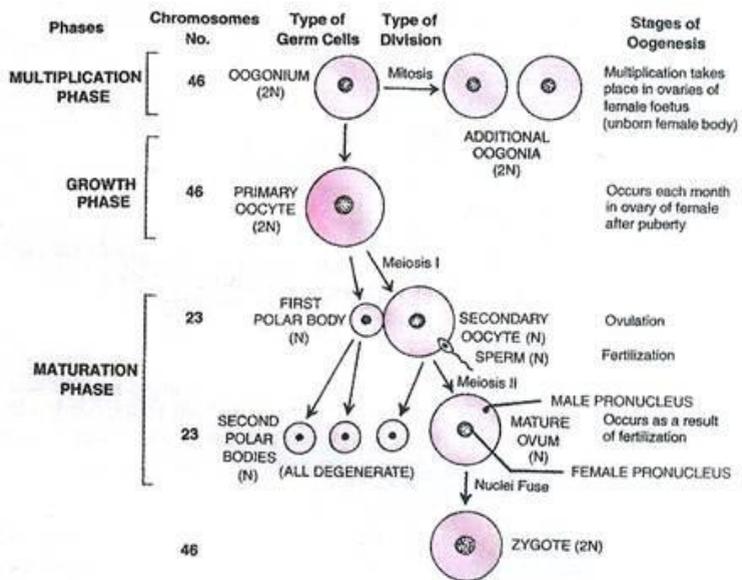
#### **2.1 Oogenesis**

Oogenesis merupakan proses pembentukan sel gamet betina (ovum) di dalam ovarium. Oosit yang masih *immature* atau yang masih kecil tumbuh dan mencapai ukuran akhir di dalam ovarium yang kemudian oosit akan matang dan siap untuk dibuahi. Proses pematangan oosit adalah peristiwa penting untuk potensi perkembangan embrio (Rodriguez & Farin, 2004). Oosit primer mereplikasi DNA dan memasuki profase I meiosis, tetapi tidak berubah lebih lanjut kecuali diaktifkan kembali oleh hormon endokrin. FSH secara periodik merangsang sebuah folikel untuk memulai pertumbuhan sekali lagi dan menginduksi oosit primernya untuk menyelesaikan pembelahan meiosis pertama (Campbell dkk., 2004).

Proses oogenesis terbagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap penggandaan, tahap pertumbuhan dan tahap pematangan (Gambar 1). Tahap penggandaan terjadi pada ovarium janin ketika masih dalam kandungan. Tahap penggandaan ini, sel primordial mengalami pembelahan mitosis membentuk oogonia yang bersifat diploid. Tahap kedua atau pertumbuhan, oogonia mengalami pembelahan mitosis membentuk oosit primer (diploid). Oosit primer kemudian mengalami fase istirahat sampai masa pubertas. Tahap ketiga yaitu tahap pematangan yang dimulai pada masa puber. Saat masa puber, oosit primer membelah secara meiosis I menghasilkan oosit sekunder dan badan polar I (Verlhac & Anne, 2010).

Menjelang saat kelahiran, semua oosit primer telah memulai profase pembelahan meiosis pertama, namun sel-sel ini berhenti melanjutkan ke tahap pembelahan metafase dan masuk ke tahap istirahat selama profase. Oosit primer tidak menyelesaikan pembelahan meiosis pertamanya sebelum memasuki masa pubertas. Saat pubertas, terjadinya proses pematangan yang melewati tiga stadium yaitu primer (pre-antral), sekunder (antral), dan pre-ovulasi (folikel graafian). Meiosis I akan menghasilkan dua anak, oosit sekunder dan badan polar I. Kemudian sel akan masuk pada tahapan meiosis II tetapi akan terhenti pada tahap metafase sebelum ovulasi, dan akan terselesaikan ketika sel terbuahi (Gambar 1). Jika tidak

terjadi pembuahan maka sel akan berdegenerasi 24 setelah terjadi ovulasi (Karlinah dkk., 2015).



(Mondal, 2016)

Gambar 1. Tahapan oogenesis pada ovarium

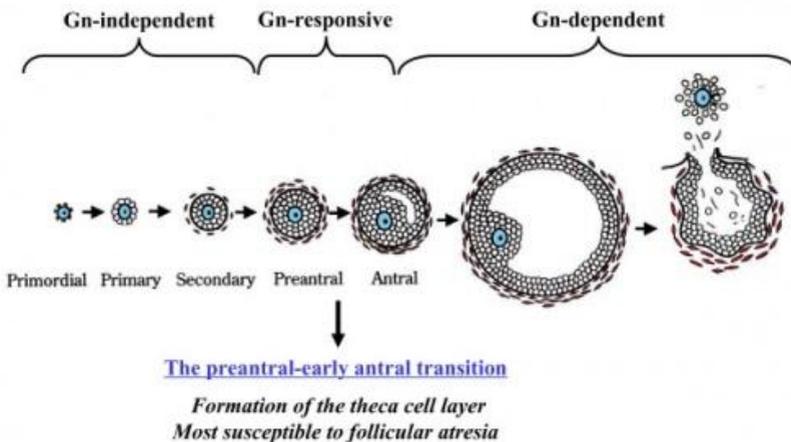
## 2.2 Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan proses perkembangan folikel di dalam ovarium, yang terdiri dari bertambahnya jumlah lapisan sel granulosa, perkembangan sel teka interna dan eksterna, perkembangan ukuran folikel, peningkatan cairan rongga folikel dan pembungkusan ovum oleh kumulus oophorus (Hafez & Hafez, 2000). Folikulogenesis adalah proses folikel primordial tumbuh dan berkembang menjadi folikel graafian. Pada wanita, folikulogenesis merupakan tahapan yang panjang yang memerlukan hampir 1 tahun untuk folikel primordial tumbuh dan berkembang ke tahap ovulasi (Erickson, 2002).

Folikulogenesis melibatkan beberapa proses yaitu rekrutmen, seleksi, pertumbuhan, pematangan, dan ovulasi (Campbell dkk., 2010). Proses folikulogenesis diawali dengan tumbuh dan

berkembangnya folikel primordial sampai menjadi folikel graafian yang siap untuk dibuahi atau akan mati oleh atresia ketika tidak terjadi pembuahan (Gambar 2) (Erickson, 2002).

Proses folikulogenesis dapat dibagi menjadi dua fase. Fase pertama disebut dengan preantral atau juga fase gonadotropin-independen yang ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi oosit. Fase kedua yaitu disebut dengan antral (Graaf) atau juga fase gonadotropin-dependen yang ditandai dengan peningkatan pesat dari ukuran folikel (Rosadi dkk., 2011). Penelitian lain menyebutkan bahwa folikulogenesis merupakan perkembangan folikel yang dimulai dari primordial hingga folikel graaf (Gambar 2). Perkembangan folikel dapat digolongkan menjadi tiga fase menurut tingkatan perkembangannya dan ketergantungan terhadap gonadotropin yaitu (1) pertumbuhan folikel melalui tahap primordial, primer, sekunder (tahap gonadotropin-independen), (2) transisi dari preantral ke tahap antral awal (tahap gonadotropin-responsive), (3) pertumbuhan selanjutnya melebihi tahap antral awal (tahap gonadotropin-dependen) yang mencakup perekrutan folikel, seleksi, dan ovulasi (Gambar 2) (Orisaka dkk., 2009).



(Orisaka dkk., 2009)

Gambar 2. Tahapan perkembangan folikel pada ovarium

Folikulogenesis diawali dengan fase folikel primordial yang sebelumnya pada masa istirahat (diploten) mulai berkembang menjadi folikel primer. Folikel primer ditandai dengan oosit yang dikelilingi oleh sel granulosa kuboidal selapis, dari sini lah sel granulosa mulai mengekspresikan FSH reseptor. Setelah itu terbentuk lah folikel sekunder yang mana folikel sekunder ditandai dengan oosit yang dikelilingi 2 -10 layer kuboidal atau kolumar sel yang membentuk epitelium bertingkat, pada tahap perubahan dari primer ke sekunder dipengaruhi oleh GDF-9 dan menghasilkan estrogen. Pada oosit sekunder ini juga terjadi pembentukan sel teka, yang terdiri dari lapisan stroma-like cells yang mengelilingi lamina basal, yang kemudian berdiferensiasi menjadi teka interna dan teka eksterna (Erickson, 2002).

Setelah dari fase sekunder didapat oosit lengkap yang dikelilingi oleh zona pelucida 6-9 sel granulosa, lamina basal dan dan teka interna eksterna. Selanjutnya adalah tahapan fase folikel deGraaf atau folikel lengkap dan akan segera mengalami ovulasi. Karena adanya peningkatan FSH dan LH yang disebabkan oleh hormon esterogen yang meningkatkan LH maka terjadilah ovulasi bagi folikel de graaf (Erickson, 2002).

### **2.3 Cairan Folikel**

Cairan folikel dapat menyediakan lingkungan mikro yang sangat penting bagi perkembangan oosit. Cairan folikel berhubungan erat dengan proses maturasi sitoplasmik. Cairan folikel merupakan produk kedua dari transfer konstituen plasma darah yang melintasi penghalang darah folikel dan aktivitas yang keluar dari granulosa dan sel teka (Revelli dkk., 2009).

Proses maturasi oosit dengan penambahan cairan folikel dalam medium seringkali dilakukan. Penelitian yang dilakukan Widayati dkk. (2014) menggunakan cairan folikel dan *fetal calf serum* (FCS) untuk konsentrasi 20% untuk proses IVM pada oosit kambing Bligon. Hasil yang didapatkan menyebutkan bahwa media yang disuplementasi CF dan FCS menghasilkan oosit *mature* yang lebih baik daripada medium tanpa suplementasi. Penelitian yang sama juga dilakukan oleh Fibrianto dkk. (2009) yang menggunakan Cairan Folikel Sapi (CFS) dan Cairan Folikel Babi (CFB) sebagai suplementasi untuk proses maturasi oosit anjing secara *in vitro*. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa medium TCM-199 yang

ditambahkan dengan cairan folikel meningkatkan maturasi *in vitro* inti oosit anjing.

Cairan folikel terbukti dapat meningkatkan maturasi oosit secara *in vitro* dikarenakan dalam cairan folikel mengandung protein-protein yang dapat membantu proses pematangan oosit. Penelitian yang dilakukan Widjiati dkk. (2008) terkait dengan protein yang terkandung pada cairan folikel menunjukkan bahwa dalam cairan folikel terdapat protein dengan berat molekul kisaran 51 kDa yang diidentifikasi sebagai protein GDF-9 yang berperan dalam proses maturasi secara *in vitro*.

Komposisi cairan folikel terdiri atas faktor-faktor yang menstimulasi kematangan oosit, seperti *insuline-like growth factor 1* (IGF-1), *IGF-binding proteins* (IGFBP<sub>5</sub>), *follicle stimulating hormone* (FSH), *lutinizing hormone* (LH), estrogen, progesteron, dan estradiol (Hafez & Hafez, 2000; Gordon, 2003). Berdasarkan hasil penelitian Tabatabaei & Mamoei (2010), komposisi biokimia cairan folikuler dalam folikel besar (diameter 10-20 mm) antara lain kalsium, fosfor, glukosa, urea, kreatinin, kolesterol, trigliserida, protein, albumin, globulin, alkanin fosfatase (ALK), laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (ASAT), dan alanin aminotransferase (ALAT). Hasil penelitian Sogorescue dkk. (2010) menunjukkan penambahan suplementasi cairan folikul dengan konsentrasi 10% pada medium TCM-199 menghasilkan perkembangan oosit domba dan kambing yang lebih baik dibandingkan dengan medium TCM-199 dengan suplementasi *epidermal growth factor* (EGF) ataupun tanpa suplementasi.

#### **2.4 Maturasi Oosit secara *In Vitro***

Menurut penelitian yang dilakukan Latifa (2007) mengatakan bahwa di dalam ovarium kambing betina terdapat sekitar 40.000 sampai 300.000 folikel. Namun hanya beberapa oosit dalam folikel saja yang terovulasikan, sehingga masih ratusan ribu folikel yang belum termanfaatkan. Oleh karena itu diperlukan adanya optimalisasi pemanfaatan folikel ovarium kambing sebagai sumber daya biologi melalui aplikasi bioteknologi. Salah satu aplikasi bioteknologi reproduksi yang dapat digunakan untuk peningkatan produktivitas ternak yaitu *In Vitro Maturation* (IVM).

Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan untuk mematangkan oosit *immature* yang dikoleksi dari ovarium yang didapatkan dari limbah

rumah potong hewan (RPH). IVM merupakan langkah awal yang dilakukan sebelum dilakukannya IVF (*in vitro fertilization*), dimana dalam maturasi oosit secara *in vitro* akan terjadi proses pematangan inti, perubahan struktural dan sitoskeletal yang bertanggung jawab untuk perkembangan embrio awal (Marques dkk., 2015).

#### **2.4.1 Faktor-faktor yang berpengaruh dalam maturasi oosit secara *in vitro***

Maturasi oosit merupakan perubahan dari oosit primer menjadi sel telur yang belum terbuahi melalui beberapa proses yang kompleks. Maturasi oosit merupakan hasil pembelahan meiosis dari tahapan prophase dari meiosis I sampai tahapan metaphase dari meiosis II (Gordon, 1994). Maturasi oosit haruslah mencakup maturasi nukleus dan sitoplasma (Widayati, 1999). Maturasi oosit dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti hormon, protein, serum, ukuran folikel, dan faktor pertumbuhan dalam medium maturasi (Rahman dkk., 2008).

Selain hormon, diketahui juga ternyata *Growth Factor* juga berperan dalam maturasi oosit secara *in vitro*. *Growth Factor* merupakan faktor lokal yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga dapat menyebabkan ekspansi sel-sel kumulus. *Growth Factor* mempunyai pengaruh penting dalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel. *Growth Factor* bekerja dalam meningkatkan transpor asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam amino sehingga dapat membentuk protein yang dapat menyebabkan sel-sel kumulus berekspansi (Frandsen, 1992).

Dalam keberhasilan proses IVM, dibutuhkan juga medium yang semirip mungkin dengan kondisi *in vivo*. Medium standart yang sering digunakan dalam proses IVM yaitu media TCM-199 yang ditambahkan dengan serum dan hormon (Boediono dkk., 2000). Selain medium TCM-199, medium yang dapat digunakan untuk proses IVM yaitu media Eagle, alpha MEM, synthetic oviduct fluid (SOF), atau Ham's F-10 (Gardner dkk., 2001).

#### **2.4.2 Kualitas oosit kompleks**

Kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium dapat dilihat dari jumlah lapisan kumulus yang mengelilingi oosit. Kriteria jumlah

lapisan kumulus yang mengelilingi oosit *immature* dikelompokkan menjadi kategori A, B dan C (Wang dkk., 2007):

1. Kategori A atau oosit dengan kualitas baik memiliki ciri oosit dikelilingi oleh sel-sel kumulus dengan jumlah banyak (lebih dari 3 lapis) dan kompak dengan ooplasma yang homogen.
2. Kategori B atau oosit dengan kualitas sedang memiliki ciri sel-sel kumulus hanya mengelilingi sebagian oosit atau oosit hanya dikelilingi oleh kurang dari tiga lapis sel-sel kumulus dengan ooplasma yang homogen.
3. Kategori C atau oosit dengan kualitas buruk memiliki ciri oosit tidak dilapisi oleh sel-sel kumulus atau oosit hanya dikelilingi selapis sel kumulus.

Menurut Suprihatin (2008), kualitas oosit domba ditentukan berdasarkan kompleks lapisan kumulus oophorus (*Cumulus Oocyte Complex*) yaitu sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit dalam kondisi utuh atau tidak. Kualitas ekspansi kumulus akan mempengaruhi tingkat keberhasilan dalam maturasi oosit. Kualitas oosit dikelompokkan berdasarkan kekompakan dan banyaknya sel kumulus yang mengelilingi oosit. Ekspansi kumulus sangat menentukan kematangan oosit, hal ini dikarenakan kumulus mengandung berbagai macam bahan aktif yang diperlukan oosit saat meiosis (Widjiati, 2010).

### **2.4.3 Ekspansi kumulus**

Proses maturasi *in vitro* ditandai dengan adanya ekspansi sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit. Hal ini berkaitan dengan fungsi sel kumulus dalam merespon rangsangan *endocrine* dan fungsi sebagai fasilitas untuk memproduksi zat-zat nutrisi yang dibawa ke oosit dan mengontrol serta mengatur metabolisme oosit yang pada gilirannya berperan dalam maturasi inti dan sitoplasma (Rahman dkk., 2008).

Sel-sel kumulus memiliki hubungan yang sangat penting dengan oosit, selain membantu dalam proses maturasi oosit ketahap metafase II juga berperan untuk kematangan sitoplasma yang diperlukan untuk perkembangan oosit setelah fertilisasi (Gustari dkk., 2009). Menurut penelitian Gordon (2003) menyatakan bahwa oosit yang telah mengalami maturasi ditandai dengan adanya ekspansi sel-sel kumulus, *germinal vesical break down* (GVBD), dan ekstruksi badan polar 1. Adanya ekspansi sel-sel kumulus merupakan ciri-ciri oosit

telah matang yang paling mudah untuk diamati. Ekspansi kumulus juga sangat penting untuk keberhasilan fertilisasi karena dapat membantu sel spermatozoa berpindah diantara sel kumulus (Widayati dkk., 2014).

Tingkat ekspansi sel kumulus pada oosit setelah mengalami maturasi dapat dilihat dari pemekaran dan perkembangan sel kumulus oosit. Tingkat ekspansi sel kumulus yang *mature* dapat dibedakan menjadi tiga kategori yaitu sebagai berikut (Rahman dkk., 2008):

- a. Kategori 1 : sel-sel kumulus terekspansi sempurna/menyeluruh.
- b. Kategori 2 : sel-sel kumulus terekspansi sebagian.
- c. Kategori 3 : sel-sel kumulus tidak terekspansi.