

Penelitian

## Efektivitas *Insulin-Like Growth Factor-I* (IGF-I) dalam Media Maturasi *In Vitro* Pada Pematangan Inti dan Fertilisasi Oosit Sapi Bali

(Effectivity of *Insulin-Like Growth Factor-I* (IGF-I) in *In Vitro* Maturation Medium on Nuclear Maturation and Fertilization Rate of Bali Cattle Oocytes)

Hasbi<sup>1,2</sup>, Sri Gustina<sup>1,4</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>3</sup>, Iman Supriatna<sup>3</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Departemen Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin

<sup>3</sup>Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

<sup>4</sup>Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Sulawesi Barat

\*Penulis untuk korespondensi: setiadio3@yahoo.com

Diterima 1 Oktober 2017, Disetujui 27 Desember 2017

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) pada tingkat pematangan inti dan fertilisasi oosit sapi bali. Penelitian ini dibagi dalam dua tahap. Tahap I, oosit dimatangkan secara *in vitro* dalam media 199 dengan penambahan 0 (kontrol), 50, 100, dan 150 ng/mL IGF-I. Tahap II, oosit dimatangkan dalam media seperti pada penelitian tahap I, kemudian difertilisasi secara *in vitro* untuk mengamati pembentukan pronukleus. Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah oosit yang mencapai tahap *metaphase II* (MII) dengan penambahan 0 (kontrol), 50, 100, dan 150 ng/mL IGF-I dalam media maturasi. Berturut-turut adalah 80,6±7,6%; 81,5±8,6%; 87,5±6,9%; dan 84,1±12,4%. Penelitian tahap II menunjukkan bahwa tingkat fertilisasi pada penambahan 100 ng/mL IGF-I dalam media maturasi nyata lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol dan penambahan 50 ng/mL IGF-I, yaitu berturut-turut 78,3±6,6%, 67,1±8,9%, dan 64,6±6,0% untuk dosis 100, 0, dan 50 ng/mL. Akan tetapi, peningkatan dosis pemberian IGF-I menjadi 150 ng/mL tidak meningkatkan tingkat fertilisasi yaitu 73,5±9,3%. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa penambahan IGF-I dalam media maturasi tidak mampu meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap MII, namun penambahan 100 ng/mL IGF-I dapat meningkatkan jumlah oosit yang terfertilisasi.

**Kata kunci:** IGF-I, pematangan inti, fertilisasi, oosit sapi bali

### ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effectivity of *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) in maturation media on nuclear maturation and fertilization rate of bali cattle oocytes. In the first experiment, oocytes were matured in media 199 supplemented with 0 (control), 50, 100, and 150 ng/mL IGF-I. In the result of the second experiment, oocytes were matured and then fertilized *in vitro* to observe pronuclear formation. The first experiment showed that there was no significant difference in the number of oocytes reached the stage of metaphases II (MII) in the media supplemented with IGF-I at doses of 0 (control), 50, 100, and 150 ng/mL were 80,6±7,6%, 81,5±8,6%, 87,5±6,9%, and 84,1±12,4% respectively. The result of second experiment showed that fertilization rate of oocytes supplemented with IGF-I at a dose of 100 ng/mL in maturation media (78,3±6,6%) was significantly higher ( $P < 0,05$ ) than those supplemented with IGF-I at doses of 0 ng/mL (67,1±8,9%) and 50 ng/mL (64,6±6,0%). However, increased doses of IGF-I supplementation in the maturation media from 100 to 150 ng/mL did not significantly affect the fertilization rate of the oocytes (78,3±6,6% vs 73,5±9,3%). In conclusion, the supplementation of IGF-I in the maturation media could not improve nuclear maturation rate. However supplementation of maturation media with 100 ng/mL IGF-I could improve fertilization rate.

**Keywords:** IGF-I, nuclear maturation, fertilization, bali cattle oocyte

## PENDAHULUAN

*Insulin-like growth factor-1* (IGF-I) adalah suatu peptida yang terdiri atas 70 asam amino dengan bobot molekul 7649 Da. Seperti halnya insulin, IGF-I mempunyai rantai A dan B yang dihubungkan dengan rantai disulfida (Laron, 2001). Dari 70 asam amino IGF-I tersebut, 29 asam amino homolog dengan insulin rantai B, 12 asam amino analog dengan peptida-insulin C dan 21 asam amino homolog dengan insulin rantai A, sedangkan 8 asam amino lainnya tidak mempunyai fungsi yang sama dengan insulin (Gill et al., 1999).

*Insulin-like growth factor-1* terlibat dalam pertumbuhan sel, proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel serta dalam regulasi metabolisme glukosa, lemak, dan protein (Schaid et al., 2002). Pada hewan mamalia, IGF-I berperan penting pada reproduksi dan dihasilkan di hipotalamus, ovarium, oviduk, dan uterus. Ekspresi reseptor IGF-I pada ternak sapi dapat ditemukan pada ovarium (oosit, sel kumulus, sel granulosa, sel teka, dan korpus luteum), oviduk (infundibulum, ampula, dan isthmus), kornua uteri (*luminal epithelium*, *superficial glands*, *deep glands*, *miometrium*, *kotiledon*, dan *karunkula*), konseptus (zigot, embrio 2–4 sel, embrio 8–16 sel, morula, blastosis, dan *elongated embryo*), dan juga diekspresikan di otak dan berperan dalam pelepasan *luteinizing hormone* (LH) (Velazquez et al., 2008). Mani et al. (2010) melaporkan bahwa IGF-I merupakan stimulator utama proliferasi seluler, diferensiasi dan perkembangan sel, regulasi proses steroidogenesis oleh sel-sel granulosa, dan apoptosis selama perkembangan folikel. Selain itu, IGF-I juga berperan menginduksi proses pembelahan mitosis pada sel-sel granulosa (Spanos et al., 2000). *Insulin-like growth factor-1* bekerja pada sel granulosa untuk proses steroidogenesis, baik secara sendiri atau bersama-sama dengan FSH (Mani et al., 2010).

Penambahan IGF-I dalam media maturasi dan kultur dilaporkan dapat menstimulasi dan meningkatkan jumlah oosit yang matang, meningkatkan fertilitas, dan jumlah embrio yang mencapai tahap blastosis pada beberapa jenis ternak, termasuk di antaranya babi (Oberlender et al., 2013), sapi (Neira et al., 2010), dan kerbau (Singhal et al., 2009). Lebih lanjut, Magalhães-Padilha et al. (2012) melaporkan bahwa penambahan IGF-I selama kultur folikel preantral babi dapat meningkatkan diameter folikel, meningkatkan ekspresi mRNA *insulin-like growth factor receptor-1* (IGFR-1) dengan penambahan *follicle stimulating hormone* (FSH) selama kultur dan oosit yang dihasilkan dapat melanjutkan proses meiosis hingga mencapai tahap *metaphase II* (MII). Hingga

saat ini, informasi penggunaan IGF-I dalam media maturasi, khususnya pada penerapan teknik produksi embrio *in vitro* pada sapi bali, belum dilaporkan. Sapi bali merupakan aset plasma nutfah asli Indonesia dengan beberapa keunggulan spesifik, di antaranya mempunyai sifat reproduksi yang sangat baik dan mempunyai fertilitas yang tinggi sehingga penambahan IGF-I dalam media maturasi diharapkan dapat memberikan respons yang lebih baik. Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas IGF-I dalam media maturasi pada tingkat pematangan inti dan fertilisasi oosit pada sapi bali.

## BAHAN DAN METODE

### *Koleksi dan Pematangan Oosit In Vitro*

Ovarium sapi bali dikumpulkan dari rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dalam larutan 0,9% NaCl ditambah 100 IU/mL penisilin dan 100 µg/mL streptomisin sulfat. Koleksi oosit dilakukan dengan teknik pencacahan (*slicing*) menggunakan medium *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah 0,2% *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, USA). Oosit diseleksi menggunakan stereomikroskop (Olympus SZ51). Hanya oosit dengan sitoplasma yang homogen dan dikelilingi oleh lebih dari tiga lapis sel kumulus yang dipilih untuk digunakan. Oosit yang telah diseleksi dicuci tiga kali pada media maturasi dan dimaturasi dalam media 199 (Gibco, USA) yang ditambahkan 0,3% BSA, 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 gentamisin (Sigma, USA). Perlakuan berupa penambahan IGF-I dengan 3 dosis, yaitu 0 (kontrol), 50, 100, atau 150 ng/mL *recombinant human IGF-I* (G-5111, Promega, USA). Konsentrasi yang digunakan mengacu pada penelitian Oberlender et al. (2013) pada oosit babi. Pematangan oosit dilakukan pada cawan petri berdiameter 35 mm (Nunclon, Denmark) dalam bentuk drop masing-masing 100 µL untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* (Sigma-Aldrich, Inc, M-8410) dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> dan temperatur 38,5°C selama 24 jam.

### *Evaluasi Tingkat Pematangan Inti*

Dua puluh empat jam setelah pematangan, sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan bantuan 0,25% hialuronidase (Sigma, USA) dan dilanjutkan dengan penghilangan sel-sel kumulus

(denudasi) dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter sekitar 110-120  $\mu\text{m}$  (sesuai dengan ukuran oosit). Oosit yang telah dihilangkan sel-sel kumulusnya diletakkan pada drop 0,7% kalium klorida (KCl) di atas gelas penutup yang memiliki bantalan parafin dan vaselin di keempat sudutnya, lalu ditutup dengan gelas objek. Preparat tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan *ethanol* (1:3) selama 3 hari. Satu jam sebelum diwarnai, preparat direndam terlebih dahulu dalam larutan *ethanol absolute*, setelah itu diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama 5 menit. Kemudian zat pewarna dibersihkan dengan 25% asam asetat dan keempat sisi gelas penutup diberi larutan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dengan mikroskop (Zeiss Axio Imager A2) yang dilengkapi dengan kamera (Zeiss AxioCam HRc).

Evaluasi tingkat kematangan inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan meiosis dari tahap *germinal vesicle* (GV) ke tahap MII. Pengamatan inti meliputi: *germinal vesicle* ditandai dengan membran inti dan nukleolus yang tampak dengan jelas, *germinal vesicle break down* (GVBD) ditandai dengan pecahnya membran inti dan inti sudah tidak terlihat dengan jelas, *metaphase I* (MI) ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang ekuator, *anaphase I* (AI) ditandai dengan perpindahan kromosom ke arah kutub, *telophase I* (TI) ditandai dengan kromosom telah mencapai dua daerah kutub, serta MII ditandai dengan adanya polar bodi I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap MI (Romar & Funahashi, 2006; Shirazi & Sadeghi, 2007). Tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII.

### Fertilisasi *In Vitro*

Koleksi dan pematangan oosit mengikuti prosedur yang sama pada penelitian Tahap I. Semen beku dicairkan pada suhu 37°C selama 20 detik dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 700 G selama 5 menit dalam media fertilisasi (Suzuki *et al.*, 2000). Setelah sentrifugasi, endapan spermatozoa diencerkan dengan media fertilisasi hingga konsentrasi akhir  $1,5 \times 10^6$  spermatozoa/mL. Setelah IVM, oosit dicuci dalam media fertilisasi sebanyak 2 kali kemudian dipindahkan ke dalam drop media fertilisasi (10-15 oosit dalam 100  $\mu\text{L}$  medium fertilisasi) dan ditutup dengan mineral oil, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada temperatur 38,5°C selama 16 jam. Tingkat fertilisasi dievaluasi berdasar-

kan pembentukan pronukleus dengan pewarnaan 2% *aceto-orcein* yang prosedurnya sama seperti pada penelitian tahap I.

### Analisis Data

Data tingkat kematangan inti dan fertilisasi disajikan dalam bentuk rata-rata persentase  $\pm$  standar deviasi dan dianalisis dengan ANOVA. Apabila terdapat perbedaan di antara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil. Data diolah menggunakan software SPSS versi 21 dan MS Office Excel 2007.

## HASIL

### Tingkat Kematangan Inti Oosit

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hampir semua oosit yang dimatangkan telah memulai proses meiosis yang ditunjukkan dengan perubahan status inti oosit dari tahap *germinal vesicle* (GV) menjadi tahap *metaphase I* (MI) hingga mencapai tahap *metaphase II* (MII), seperti yang disajikan pada Tabel 1. Persentase oosit yang mencapai tahap MII setelah proses pematangan berturut-turut adalah kontrol (80,6 $\pm$ 7,6%), kelompok 50 ng/mL IGF-I (81,5 $\pm$ 8,6%), 100 ng/mL IGF-I (87,5 $\pm$ 6,9%), dan 150 ng/mL IGF-I (84,1 $\pm$ 12,4%). Tidak ditemukan adanya perbedaan yang nyata dari oosit pada semua kelompok perlakuan yang mencapai tahap MII ( $P > 0,05$ ).

### Tingkat Fertilisasi

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah oosit yang terfertilisasi bervariasi berdasarkan perlakuan. Persentase total (membentuk 2 atau  $>2$  pronukleus) setelah oosit yang terfertilisasi berturut-turut adalah kelompok kontrol (67,1 $\pm$ 8,9%), kelompok 50 ng/mL IGF-I (64,6 $\pm$ 6,0%), 100 ng/mL IGF-I (78,3 $\pm$ 6,6%), dan 150 ng/mL IGF-I (73,5 $\pm$ 9,26%). Dari data tersebut ditemukan bahwa penambahan 100 ng/mL IGF-I dalam media maturasi menghasilkan tingkat fertilisasi yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan kelompok lainnya. Persentase oosit yang terfertilisasi secara normal yang ditandai dengan terdapat dua pronukleus lebih tinggi pada kelompok 100 ng/mL IGF-I ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok 50 ng/mL IGF-I, tetapi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok 150 ng/mL IGF-I, sedangkan jumlah oosit yang membentuk lebih dari 2 pronukleus (polispermia) ditemukan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) pada semua perlakuan.

Tabel 1 Tingkat kematangan inti oosit sapi bali dengan penambahan IGF-I dalam media maturasi

IGF-I (ng/mL)	N	Tingkat Kematangan Inti (% rata-rata ± SD)					
		GV	GVBD	MI	AI/TI	MII	Degenerasi
Kontrol	108	2 (1,8 ± 4,0)	0 (0 ± 0,0)	15 (13,9 ± 5,6)	0 (0 ± 0,0)	87 (80,6 ± 7,6)	4 (3,7 ± 6,7)
50	103	1 (1,0 ± 1,1)	0 (0 ± 0,0)	13 (12,6 ± 7,0)	0 (0 ± 0,0)	84 (81,5 ± 8,6)	5 (4,9 ± 6,6)
100	112	0 (0,0 ± 0,0)	0 (0 ± 0,0)	12 (10,7 ± 6,1)	0 (0 ± 0,0)	98 (87,5 ± 6,9)	2 (1,8 ± 3,8)
150	107	0 (0,0 ± 0,0)	0 (0 ± 0,0)	13 (12,2 ± 9,5)	1 (0,9 ± 3,9)	90 (84,1 ± 12,4)	3 (2,8 ± 5,9)

Kontrol (tanpa penambahan IGF-I), IGF-I (*insulin-like growth factor I*), GV (*germinal vesicle*), GVBD (*germinal vesicle breakdown*), MI (*metaphase I*), AI-TI (*anaphase I/teelophase I*), MII (*metaphase II*).

Tabel 2 Tingkat fertilisasi oosit sapi bali dengan penambahan IGF-I dalam media maturasi

IGF-I (ng/mL)	N	Pembentukan Pronukleus (PN)		Tingkat Fertilisasi (% rata-rata ± SD)
		2 PN (% rata-rata ± SD)	>2 PN (% rata-rata ± SD)	
Kontrol	73	45 (61,6 ± 7,8) <sup>ab</sup>	4 (5,5 ± 8,5)	49 (67,1 ± 8,9) <sup>a</sup>
50	65	35 (53,8 ± 9,5) <sup>a</sup>	7 (10,8 ± 10,2)	42 (64,6 ± 6,0) <sup>a</sup>
100	69	48 (69,6 ± 12,2) <sup>b</sup>	6 (8,7 ± 9,0)	54 (78,3 ± 6,6) <sup>b</sup>
150	68	42 (61,8 ± 11,7) <sup>ab</sup>	8 (11,8 ± 9,4)	50 (73,5 ± 9,3) <sup>ab</sup>

IGF-I (*insulin-like growth factor I*), kontrol (tanpa penambahan IGF-I), huruf superskript yang berbeda (a,b) dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

## PEMBAHASAN

Selama pertumbuhan oosit untuk meningkatkan kompetensinya, proses metabolisme terjadi pada oosit dan sel-sel folikel yang menghasilkan beberapa komponen, termasuk IGF-I. *Insulin-like growth factor-1* ini, dihasilkan di folikel (Coleman et al., 2007) dan korpus luteum (Woad et al., 2000) yang ditunjukkan dengan adanya ekspresi reseptor IGF-I pada sel kumulus, sel granulosa, sel teka, dan korpus luteum. Konsentrasi IGF-I meningkat secara progresif selama pertumbuhan folikel hingga mencapai folikel dominan sampai ovulasi (Mao et al., 2004). Lebih lanjut dijelaskan bahwa IGF-I berperan menginisiasi pertumbuhan folikel primordial ke folikel primer dan pertumbuhan folikel primer ke folikel sekunder. Pada folikel sekunder ke folikel antral, IGF-I berkontribusi untuk pertumbuhan dan pemeliharaan folikel, proliferasi, dan diferensiasi sel-sel granulosa (Silva et al., 2009), produksi estradiol, serta menginduksi ekspresi reseptor FSH pada sel granulosa (Hurk & Zhao, 2005). Sementara itu, IGF-I pada folikel antral ke folikel preovulasi berkontribusi meningkatkan reseptor LH pada sel-sel granulosa dan sel-sel teka sehingga folikel lebih sensitif terhadap hormon gonadotropin (Silva et al., 2009).

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini ditemukan bahwa penambahan IGF-I eksogen dalam media maturasi tidak mempengaruhi tingkat kematangan inti pada oosit sapi bali (Tabel 1). Hasil penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Singhal et al. (2009) bahwa penambahan IGF-I dalam media maturasi tidak dapat meningkatkan jumlah

oosit kerbau yang matang. Hal ini kemungkinan disebabkan karena oosit yang digunakan pada penelitian ini berasal dari folikel tersier yang telah memiliki kemampuan untuk memulai proses meiosis setelah dikeluarkan dari folikel sehingga penambahan IGF-I dan komponen lainnya tidak nyata mempengaruhi perkembangan oosit lebih lanjut. Beberapa peneliti melaporkan bahwa oosit yang berasal dari folikel tersier telah memiliki komponen-komponen penting yang diperlukan untuk memulai proses meiosis, seperti *reactive oxygen species* (ROS), antioksidan, hormon, dan metabolit (Hennet & Combelles, 2012), glukosa, piruvat, dan glisin (Pintero-Sagredo et al., 2010). Setiap komponen dari folikel tersier tersebut berperan penting untuk mendukung proses diferensiasi dan fertilisasi oosit (Hennet & Combelles, 2012). Sementara itu, konsentrasi hormon pada cairan folikel mempengaruhi proses diferensiasi oosit, baik secara langsung maupun tidak langsung. Hormon yang terdapat pada cairan folikel di antaranya adalah FSH, LH, *growth hormone* (GH), *human chorionic gonadotrophin* (hCG), progesteron, dan estradiol (Hennet & Combelles, 2012). Secara umum, konsentrasi FSH, hCG, dan LH yang tinggi pada cairan folikel dapat mendukung pematangan oosit dan berkorelasi dengan kemampuan yang tinggi untuk terfertilisasi (Revelli et al., 2009). Oosit yang dikeluarkan dari folikel secara spontan akan memulai proses meiosis secara *in vitro* (Gilchrist & Thompson 2007).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan 100 ng/mL IGF-I dalam media maturasi dapat

meningkatkan jumlah oosit sapi bali yang terfertilisasi (Tabel 2). Hal ini kemungkinan karena penambahan konsentrasi 100 ng/mL IGF-I dalam media maturasi optimum dapat mencegah terjadinya apoptosis selama proses pematangan sehingga meningkatkan kualitas oosit yang mencapai tahap MII dan jumlah oosit yang terfertilisasi. Meiyu *et al.* (2011) melaporkan bahwa penambahan IGF-I dalam media maturasi dapat mengurangi terjadinya apoptosis DNA pada oosit. Selain itu, IGF-I merupakan stimulator utama proliferasi seluler, diferensiasi dan perkembangan sel, regulasi proses steroidogenesis oleh sel-sel granulosa dan apoptosis selama perkembangan folikel (Mani *et al.*, 2010), serta menginduksi proses pembelahan mitosis pada sel-sel granulosa (Spanos *et al.* 2000). Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa hasil peneliti sebelumnya bahwa penambahan IGF-I dalam media maturasi dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi pada oosit babi (Oberlender *et al.*, 2013) dan kerbau (Purohit *et al.*, 2005). Penambahan 50 ng/mL IGF-I dalam media maturasi yang diduga belum optimal meningkatkan tingkat fertilisasi diduga disebabkan karena IGF-I yang ditambahkan belum optimal dapat mencegah terjadinya apoptosis selama proses pematangan, sedangkan penambahan 150 ng/mL IGF-I diduga konsentrasi tersebut terlalu tinggi sehingga menyebabkan pada fertilisasi menurun. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan sebelumnya oleh Oberlender *et al.* (2013) bahwa konsentrasi optimum IGF-I yang dibutuhkan dan memberikan efek positif pada tingkat fertilisasi adalah sekitar 135 ng/mL.

Hurk dan Zhao (2005) menjelaskan bahwa IGF-I berperan untuk memulai proses meiosis dengan menstimulasi pembentukan reseptor LH pada sel granulosa. Proses pematangan oosit merupakan respon terhadap LH surge yang menyebabkan terjadinya beberapa perubahan jalur regulasi seperti fosforilasi protein, *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), dan kadar kalsium (Gordo *et al.*, 2001). Mekanisme proses meiosis diawali dengan teraktivasi protein G yang akan mengaktifkan fosfolipase C sehingga fosfoinositida terhidrolisis membentuk inositol trifosfat yang menyebabkan terjadinya mobilisasi  $Ca^{2+}$  intraseluler dan diikuti dengan influks  $Ca^{2+}$  ekstraseluler (Homa, 1995). Influks  $Ca^{2+}$  ekstraseluler selain menghambat adenilil siklase yang menyebabkan penurunan cAMP/PKA, juga mengaktifkan *calmoduline-dependent protein kinase* (CaM II kinase) yang akan memodifikasi atau mengaktifkan *maturatiion promoting factor* (MPF) (Hurk & Zhao, 2005). Lebih lanjut dilaporkan bahwa selama proses pematangan, oosit mengalami serangkaian perubahan

tidak hanya pada inti tetapi juga pada sitoplasma. Proses pematangan sitoplasma diperlukan untuk mencegah terjadinya polispermi pada saat fertilisasi, dekondensasi spermatozoa, pembentukan pronukleus, redistribusi organel sel, serta migrasi mitokondria ke posisi perinuklear dan granula kortikal kesepanjang membran ooplasma.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan IGF-I dalam media maturasi tidak meningkatkan kematangan inti oosit yang mencapai tahap MII, namun demikian penambahan 100 ng/mL IGF-I dapat meningkatkan jumlah oosit yang terfertilisasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristekdikti untuk beasiswa Program Pascasarjana dalam negeri (BPPDN) dan Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA, DES untuk izin fasilitas laboratorium yang digunakan.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

### DAFTAR PUSTAKA

- Coleman NV, Shagiakhmetova GA, Lebedeva IY, Kuzmina TI, Golubev AK. 2007. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology* 67:1053-1059.
- Gill R, Verma C, Wallach B, Urso B, Pitts J, Awollmer, De Meyts P, Wood M. 1999. Modeling of the disulphide-swapped isomer of human insulin-like growth factor-I: Implication for receptor binding. *Protein Engineering* 12(4):297-303.
- Gordo AC, He CL, Smith S, Fissore RA. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 59:106-114.
- Hennet ML, Combelles CMH. 2012. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology* 56: 819-831.
- Homa ST. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 40:122-134.

- Hurk RVN, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63:1717-1751.
- Laron Z. 2001. Insulin like growth factor I (IGF-I): a growth hormon. *Molecular Pathology* 54:311-316.
- Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Singh D, Wathes DC. 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositoldependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139:139-151.
- Magalhães-Padilha DM, Duarte ABG, Araújo VR, Saraiva MVA, Almeida AP, Rodrigues GQ, Matos MHT, Campello CC, Silva JR, Gastal MO et al. 2012. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology* 77:206-213.
- Meiyu QI, Roth Z, Di L. 2011. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in reproduction system of female bovine. *Journal of Northeast Agricultural University* 18(4): 84-87.
- Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC. 2004. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *Journal of Animal Science* 82:1967-1975.
- Neira JA, Tainturier D, Pen MA, Martal J. 2010. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- $\beta$ 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 73:595-604.
- Oberlender G, Murgas LDS, Zangeronimo MG, da Silva AC, Menezes TA, Pontelo TP, Vieira LA. 2013. Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 80:319-327.
- Pinero-Sagredo E, Nunes S, Delossantos MJ, Celda B, Esteve V. 2010. NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR Biomedicine* 23:485-495.
- Purohit GN, Brady MS, Sharma SS. 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Animal Reproduction Science* 87:229-239.
- Revelli A, Delle-Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolic. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 1-13.
- Romar R, Funahashi H. 2006. In vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B kinase. *Animal Reproduction Science* 92:321-333.
- Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. 2002. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics* 70(2):425-434.
- Silva JRV, Figueiredo JR, Hurk RVD. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71:1193-1208.
- Shirazi A, Sadeghi N. 2007. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Research* 69:103-107.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi, Hosseini SM, Karimi I. 2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Small Ruminant Research* 68: 291-295
- Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP. 2009. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. *Animal Reproduction Science* 113:44-50.
- Spanos S, Becker DL, Winston RML, Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biology Reproduction* 63:1413-1420.
- Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodrigues-Martines H. 2000. Effect of hyaluronan on monopospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *International Journal Andrology* 23:13-21.
- Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal and Endocrinology* 35:325-342.
- Woad KJ, Baxter G, Hogg CO, Bramley TA, Webb R, Armstrong DG. 2000. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Reproduction and Fertility* 120:293-302.