TINGKAT FERTILISASI *IN VITRO* OOSIT SAPI HASIL PEMATANGAN DENGAN MEDIUM YANG DISUPLEMENTASI PREGNANT MARES SERUM GONADOTROPIN

Oleh
Tinda Afriani

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengatahui tingkat fertilisasi oosit yang dimatangkan dengan medium yang disuplementasi FSH dan PMSG

Oosit yang digunakan diperoleh dari ovarium sapi yang dipotong di Rumah potong Hewan Padang. Oosit kualitas A dan B mempunyai sitoplasma yang homogen dan sel kumlus kompak dimatangan dalaqm 2 macam medium yaitu medium TCM yang disuplementasi dengan hormon PMSG dan FSH. Oosit matang selanjutnya di fertilisasi dengan sperma segar. Fertilisasi dilakukan dalam medium mBO selama 17 jam. Jumlah pronukleus terbentuk pada oosit yang difertilisasi diamati dengan bantuan pewarnaan orcein. Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan uji t.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat fertilisasi oosit yang dimatangkan dengan medium yang disuplementasi FSH (30.53 ± 12.85) tidak berbeda dengan medium yang yang disuplementasi PMSG(31.27±15.47).

Dapat disimpulkan bahwa PMSG dapat digunakan sebagai alternatif pengganti FSH dalam pematangan oosit in vitro

Key word : Fertilisasi in vitro, FSH dan PMSG

I. PENDAHULUAN

Kebutuhan terhadap produksi peternakan seperti daging terus meningkat sejalan dengan meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap gizi. Namun demikian peningkatan tersebut belum diimbangi oleh penyediaannya. Khusus untuk daging, laporan Dirjen Peternakan 2000 menunjukkan bahwa komsumsi masyarakat meningkat sebesar 6,9 %, sementara kemampuan penyediaannya berdasarkan laju perkembangan populasi kerbau dan sapi sebagai sumber utamanya hanya 6,3 %. Kekurangan produksi tersebut dipenuhi dengan mengimpor baik dalam bentuk daging beku maupun sapi bakalan. Keadaan ini tentu tidak menguntungkan karena akan menguras devisa negara.

Peningkatan produksi dapat dilakukan melalui dua pendekatan yaitu peningkatan populasi ternak dan perbaikan mutu genetik. Perbaikan genetik karena memerlukan waktu yang lama, akan lebih efektif jika dilakukan menggunakan terobosan-terobosan baru dalam bidang bioteknologi seperti bioteknologi reproduksi. Penerapan bioteknologi reproduksi seperti Inseminasi Buatan (IB) telah memberikan kontribusi yang cukup signifikan terhadap peningkatan produksi ternak. Disamping teknologi tersebut, belakangan ini juga mulai dikembangkan teknologi Transfer Embrio (TE) dan Fertilisasi *In Vitro* (FIV).

Teknologi FIV merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan (media di luar tubuh). Teknologi FIV terdiri dari serangkaian kegiatan yang meliputi pematangan dan fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio *in vitro*. Dengan FIV, embrio yang selama ini dihasilkan secara *in vivo* dalam penerapan TE, dapat dihasilkan secara *in vitro* dengan memanfaatkan oosit hewan dipotong dari rumah potong atau hewan yang mati, sehingga embrio dapat dihasilkan secara massal dan lebih murah. Keberhasilan dari

teknologi FIV dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain media yang digunakan, kualitas oosit dan sistem inkubasi dari setiap tahap.

Media yang digunakan untuk pematangan maupun kultrur embrio adalah TCM-199. Untuk menunjang kehidupan dan perkembangan oosit media harus diuplementasi dengan hormon dan dan serum. Hormon merupakan komponen termahal dari suatu media. Pada saat ini jenis hormon yang banyak digunakan adalah Folicle Stimulating Hormon (FSH) yang dihasilkan oleh Hipofisa. Hormon FSH berperanan menstimulasi proses perkembang-an oosit untuk mencapai tahap matang atau mempunyai Polar Podi I (PB I). Disamping FSH pada ternak kuda juga dihasilkan hormon yang mempunyai kerja analog dengan FSH yaitu hormon PMSG. Dibandingkan dengan hormon FSH hormon PMSG relatif murah harganya, sehingga diharapkan juga dapat dimanfaatkan untuk pematangan oosit in vitro. Hormon FSH merupakan hormon yang dihasilkan oleh hipofisa anterior bersama hormon gonadotrpin lainnya. Hormon ini merupakan hormon glikoprotein yang mengandung gugus polipeptida dan asam sialat (Hafez, 2000). Hormon FSH seperti halnya dengan hormon LH terdiri dari dua rantai yaitu rantai alfa dan rantai beta. Rantai alfa hampir sama diantara spesies dan rantai beta merupakan spesifik diantara spesies (Hafez, 2000 dan Gordon 1994). Fungsi hormon FSH adalah menstimulasi pematangan oosit dalam folikel dan pada hewan jantan juga beperanan dalam proses spermiosis atau pematangan sperma (Toelihere, 1981).

Pada ternak kuda yang bunting muda didapatkan hormon yang kerjanya analog dengan FSH yaitu PMSG. Hormon ini terutama dihasilkan antara hari ke 40 sampai hari ke 160 usia kebuntingan. Dalam manipulasi reproduksi hormon PMSG juga digunakan untuk mendorong superovulasi sebagai alternatif dari penggunaan hormon FSH

(Jaswandi 1996). Hasil penelitian sebelumnya membuktikan bahwa PMSG dapat menggantikan peranan FSH dalam pematangan secara in vitro (**Afriani dkk., 2005**). Dalam penetian tersebut diperoleh tingkat kematangan inti oosit sapi secara in vitro dalam medium yang disuplementasi dengan PMSG mencapai 47%.

II. TUJUAN PENELITIAN

1. Untuk mengetahui tingkat fertilisasi *in vitro* oosit yang dimatangkan dengan medium yang disuplementasi dengan PMSG
2. Untuk mengetahui proses pembentukan pronukleus pada oosit yang dimatangkan dengan medium yang disuplementasi dengan PMSG.

III. MANFAAT PENELITIAN

Meningkatkan efisiensi produksi embrio secara *in vitro* sehingga lebih memungkinkan untuk diaplikasikan dilapangan atau pada peternakan rakyat dengan mencari hormon alternatif dari FSH yang mempunyai harga lebih murah

IV. METODE PENELITIAN

1. Materi Penelitian

Bahan bahan yang digunakan adalah ovarium ternak yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH). Bahan kimia habis terpakai yaitu NaCl fisiologis, Tissue culture medium (TCM-199, M-5017, Sigma), Dulbecco's Phosphate Buffers Solution (PBS, Nissui, Japan), Folicle Stimulating Hormone (FSH, Sigma), PMSG (Intravet), Hepes (H-1617, Sigma), gentamisin, Calf Serum (CS, Sigma), deionised water, mineral oil, alcohol, orcein dan tissue. Alat-alat utama yang digunakan adalah cawan petridis 35 dan 60 mm, pipet Pasteur, disposable syringe, filter Millipore, inkubator, timbangan listrik, oven, laminar flow, mikroskop, pipet eppendorf, refrigerator, objek dan cover glass dan gas pak.

2. Metode Penelitian

Koleksi oosit

Ovarium dari Rumah Potong Hewan dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi media NaCl fisiologis (0.9 %) pada temperatur 30 - 35 ^{0}C. Setelah dibersihkan berat, panjang, diameter dan tebal ovarium diukur dan folikel berdasarkan ukurannya (<2, 2-6 dan >6) dihitung. Koleksi oosit dari bagian periperal ovarium dilakukan dengan cara aspirasi kemudian dilanjutkan dengan menyayat ovarium (*slicing*) untuk mendapatkan oosit dari bagial kortikal, dan oosit yang terlepas diamati dibawah mikrokop. Jumlah dan kualitas (A, B, dan C/D) oosit dari kedua bagian dihitung. Perolehan oosit bagian kiri dan kanan dihitung secara terpisah. Oosit yang digunakan dalam pematangan adalah oosit

yang dikelilingi sel-sel kumulus dan mempunyai sitoplasma yang homogen (A dan B) yang dikategorikan menurut Loos, *et al*., (1983)

Pematangan oosit in vitro

Oosit berkualitas A dan B yang diperoleh dicuci 3 kali dalam medium PBS dan dilanjutkan dalam medium pematangan TCM-199 yang disuplementasi 30 mM HEPES. Perlakuan hormonal dilakukan dengan membagi dua kelompok pematangan oosit secara in vitro yaitu pematangan oosit menggunakan medium TCM-199 yang mengandung **10 µg FSH/ml**, 10 % Calf Serum (CS) dan 50 µg gentamisin/ml dan pematangan oosit menggunakan medium TCM-199 yang mengandung **10 µg PMSG**/ml, 10 % Calf Serum (CS) dan 50 µg gentamisin/ml. Pematangan oosit dilakukan dalam 100 µl (drop) dari medium pematangan yang ditutup dengan minyak mineral dalam petridish 30 mm. Oosit dikultur dalam inkubator pada temperatur 39 ^{0}C selama 24 jam.

Fertilisasi *In Vitro*

Oosit yang telah matang menggunakan medium yangdisuplementasi FSH dan PMSG difertilisasi secara in vitro dengan metode yangan sama. Prosedur fertilisasi dilakukan menurut yang dikemukakan Jaswandi *et al* (2001).

Sperma yang digunakan adalah sperma segar yang dtampung dengan menggunakan vagina buatan. Sperma yang diperoleh ditambah dengan 6 ml Brackhet dan Oliphant (B-O), lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Endapan yang diperoleh diencerkan sampai konsentrasi 10 x 10^{6} sperm/ml dengan medium kapasitasi B-O. Medium disuplementasi dengan *caffeine-sodium benzoat*5 mM (Sigma, C-4144), heparin 20 µg/ml, Serum sapi estrus 10%, streptomisin100 µg/ml dan penicillin 100 IU/ml . Sperma dalam medium kapasitasi diinkubasi selama 30 menit.

Sperma yang telah terkapasitasi diencerkan sampai konsentrasi 5 x 10^6 sperma/ml. Oosit dari perlakuan pematangan dengan FSH dan PMSG kemudian diinkubasi dengan sperma yang diencerkan dengan medium B-O pada mikrodrop (masing-masing 100 µl medium) dalam 2 cawan petri yang berbeda. Fertilisasi dilakukan selama 17 jam pada suhu 38,5^{0}C. Setelah dicuci tiga kali oosit dipindahkan ke dalam medium yang mengandung sperma.

Evaluasi Tingkat Fertilisasi

Oosit yang telah difertilisasi dibersihkan dari sel-sel kumulus dan sisa sperma yang menempel dengan memipet beberapa kali dalam medium PBS yang mengandung hyoluronidase(Sigma, USA) 1%. Oosit yang telah bersih difiksasi selama 48 jam dalam larutan alkohol absolut : asetat glacial (3:1). Oosit selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan orcein 1% (Sigma, USA) selama 10 menit lalu dicuci dengan gliserol asetat dan dikeringkan. Jumlah pronukleus terbentuk diamati dibawah mikroskop.

Peubah yang Diamati

1. Tingkat fertilisasi *in vitro* dihitung berdasarkan terdapatnya 2 atau lebih pronukleus dalam oosit yang difertilisasi
2. Pembentukan pronukleus betina dan jantan yang ditentukan berdasarkan jumlah pronukleus dalam oosit. Oosit yang mempunyai satu pronukleus berarti yang terbentuk hanya pronukleus betina kalau dua atau lebih berarti terbentuk pronukleus jantan dan betina.

3. Analisis Data

Data tingkat penetrasi oosit dan perubahan morfologi sperma diolah secara statistik dengan analisis uji T menurut prosedur Steel dan Torrie (1984).

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan fertilisasi dapat terlihat dari keberhasilan anak yang dilahirkan. Disamping itu secara *in vitro* dapat diketahui atau diukur dari pembentukan pronukleus. Persentase oosit yang mempunyai 2 pronukleus atau lebih setelah fertilisasi setelah dimatangkan secara *in vitro* dalam medium yang disuplementasi FSH dan PMSG dapat dilihat pada Tabel berikut.

Tabel 1. Persentase oosit terfertilisasi setelah dimatangkan dalam medium yang disuplementasi dengan hormon FSH dan PMSG.

Perlakuan	Status oosit	
	1 pronukleus	2 pronukleus
FSH	12.025 ± 8.451^{a}	30.53 ± 12.85^{a}
PMSG	13.72 ± 13.72^{a}	31.27 ± 15.47^{a}

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0.05)

Hasil analisis statistik dengan uji t menunjukkan bahwa perlakuan hormon yang digunakan dalam pematangan oosit secara *in vitro* tidak menunjukkan perbedaaan yang nyata (P.>0.05) terhadap tingkat fertilisasi. Hal ini berarti bahwa kondisi biologis oosit yang dimatangkan dengan hormon PMSG sama dengan yang dimatangkan dengan FSH. Pregnant Mares Serum Gonadotropin (PMSG) merupakan hormon yang mempunyai daya kerja sama dengan FSH yaitu menstimulasi perkembangan folikel dan pematangan folikel Hormon ini dihasilkan oleh mangkok endometrium kuda bunting antara hari ke 40 sampai hari ke 100.

Potensi biologis yang sama antara FSH dengan PMSG terlihat pada hasil penelitian yang dilakukan pada tahap pematangan. Dalam penelitian sebelumnya Afriani

dkk., (2005) melaporkan hasil pematangan oosit secara *in vitro* yang tidak berbeda dengan menggunakan medium pematangan yang disuplementasi dengan FSH dan PMSG. Hasil yang sempa juga dilaporkan Jati (1993) yang mendapatkan persentase kematangan inti menggunakan hormon FSH sebesar 90.2 % dan menggunakan PMSG 91. %. Daya kerja yang sama juga terlihat pada penggunaan FSH dan PMSG dalam teknik superovulasi Hasil penelitian Jaswandi (1996) menunjukkan bahwa sapi yang disuperovulasi dengan PMSG menghasilkan jumlah korpus luteum yang hampir sama banyak dengan disuperovulasi dengan FSH.

Perbedaan tingkat fertilisasi yang tidak nyata diantara kedua tiga perlakuan hormon, juga merupakan implikasi dari kondisi pematangan *in vitro* yang hampir sama jsejalan dengan yang dikemukakan oleh Hyttel *et al.* (1997). Pengamatan yang dilakukan terhadap struktur oosit selama pematangan menunjukkan bahwa pada bagian sitoplasmik ditandai oleh perkembangan secara terus menerus dari cadangan lipid oosit, pengurangan pada bagian golgi dan penjajaran barisan butiran kortikal membentuk struktur dasar untuk menghambat polyspermia. Peningkatan secara gradual dari bagian lipid oosit selama kapasitasi dan pematangan tersebut diduga sangat penting untuk memulai perkembangan fase embrionik. Lipid merupakan tempat penimbunan energi, sama halnya dengan kuning telur pada ayam dan digunakan sampai tahap blastosis.

Tingkat keberhasilan fertilisasi baik menggunakan FSH dan PMSG sedikit lebih rendah dari yang dilaporkan pada ternak domba yaitu berkisar 42 – 51 % (Jaswandi, 2002) maupun pada ternak sapi (Boediono *et al.*, 2003). Perbedaan hasil yang diperoleh dapat disebabkan oleh beberapa factor seperti kualitas oosit, bangsa, teknik seleksi oosit, medium yang digunakan, komposisi gas dan teknik inkubasi (Gordon, 1994).

Persentase oosit dengan satu pronukleus yang tidak berbeda juga menunjukkan bahwa kondisi biologis oosit tersebut diantara kedua perlakuan hormon tidak berbeda. Kegagalan pembentukan dapat disebabkan kegagalan sperma menembus oosit, atau mengalami perubahan sebelum pembentukan pronukleus II seperti dekodensasi maupun kondensasi. Penjajaran kortikal di bagian dekat zona pelusida yang lebih awal pada sebagian oosit yang lebih dulu matang (Hyttel et al., 1997) menyebabkan oosit tersebut sulit ditembus oleh sperma. Selanjutnya Jaswandi dkk (2006) menyatakan bahwa ± 44 % dari sperma yamasuk ke dalam oosit waktu fertilisasi gagal untuk mengalami dekodensasi.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

   PSMG dapat digunakan sebagai hormon alternatif dalam produksi embrio *invitro* khsusnya pada tahap pematangan oosit secara *in vitro*. Tingkat Fertilisasi *in vitro* oosit yang dimatangkan dalam medium yang disuplementasi PMSG tidak bebeda nyata dengan medium yang disuplementasi FSH.

2. Saran.

   Perlu penelitian lebih lanjut mengetahui perkembangan oosit pada tahap embrio hasil pematangan dengan medium yang disuplementasi dengan PMSG.

DAFTAR PUSTAKA

Afriani, T. 2005. PotensiPregnat Mare's Serum Gonadotropin dalam pematangan Oosit secara in vitro. Lembaga Penelitian Universitas Andalas

Boediono, A., T. Suzuki and R.A. Godke. 2003. Comparison of purebred and hybred in vitro-derived cattle embryos during invitro culture. Anim. Reprod. Sci. 78:1-11

Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Bio Reprod. 12:260-274.

Chian, R.C., H. Nakahara, K. Niwa and H. Funahashi. 1992. Fertilization and early cleavage in vitro of aging bovine oocytes after maturation in culture. Theriogenology. 37: 666-672

Djati, M.S. 1999. Pengaruh Suplementasi PMSG dan hCG Pada Proses Fertilisasi *In Vitro* dan Kultur Klon Embrio Sapi Dengan IGF-I. Disertasi Pascasarjana IPB. Bogor.

Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Biotechnology in Agricultural Series. CAB. Int.

Hyttel, P., T. Fair, H. Callesen and T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47:23-32.

Jaswandi. 1996. Kualitas dan kuantitas embrio hasil superovulasi dengan berbagai dosis Folicle Stimulating Hormon pada sapi Simental. Laporan Penelitian BBI Dikti.

Jaswandi, A. Boediono and M.A.Setiadi. 2001. *In vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes in absences CO_2. Reprotech Journal. 1 : 56-60.

Jaswandi, M. A. Setiadi, A. Boediono, M.R. Toelihere dan Y. Sukra. 2006. Pesentase oosit terpenetrasi dan perubahan morfologi sperma pada fertilisasi in vitro dengan system inkubasi tanpa CO2 5%. Seminar Nasional Biologi Reproduksi, Bogor, 2006

Loos, F., C.van Vliet, P. van Maurik and T. A.M. Kruip. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamet Res. 24 : 197-204.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1984. Prosedur dan Metode Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa B. Soemantri. Gramedia. Jakarta.