

ARTIKEL

Tinda Afriani. 2004. Viabilitas Sperma dengan Berbagai Perlakuan Kapasitas dan Tingkat Fertilisasi *In Vitro* pada Sapi Pesisir.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari atau mengetahui kemampuan oosit hasil pematangan *in vitro* tanpa CO₂ 5% dan untuk mendapatkan media fertilisasi *in vitro* serta mendapatkan waktu preinkubasi pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%.

Oosit yang mempunyai kumulus yang utuh dimatangkan secara *in vitro* dalam medium TCM-199 yang disuplementasi dengan Folicle Stimulating Hormone (FSH) 10µg/ml, Gentamisin 50 µg/ml dan Hepes 30 mM. Untuk mempersiapkan sperma yang akan membuahi oosit, terlebih dahulu dilakukan pengamatan terhadap 5 periode waktu preinkubasi (0, 30, 60, 90 dan 120 menit) dalam 3 macam media (Brackett-Oliphant atau B-O, modified B-O atau mBO dan TCM-199 yang disuplementasi Hepes). Fertilisasi menggunakan medium B-O dilakukan dalam 100 µl drop dalam cawan petri. Setiap cawan petri selanjutnya dimasukkan ke dalam gas pak berisi udara yang mengandung CO₂ 5% dan diinkubasi dan inkubator dengan suhu 38°C. fertilisasi menggunakan medium mB-O dan TALPS dilakukan dalam straw. Setiap straw berisi 15-20 oosit dan sperma 5×10⁶/ml lalu diinkubasi dengan cara yang sama dengan medium B-O.

Data tingkat fertilisasi dan waktu preinkubasi diolah dengan analisis variance (anova) dan data perkembangan embrio menggunakan chi-square analisis (Steel dan Torrie, 1984).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa periode inkubasi sperma selama 30 menit memberikan hasil terbaik, baik untuk medium B-O pada sistem inkubasi CO₂ 5% maupun pada medium mB-O dan TCM yang disuplementasi Hepes 30 mM pada inkubasi tanpa CO₂ 5%. Medium modifikasi B-O (mB-O) memberikan hasil yang sama baik dari medium TALPS.

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa fertilisasi *in vitro* CO₂ 5% dapat dilakukan dengan menggunakan mB-O dan TALPS dengan waktu preinkubasi yang optimal selama 30 menit.

PENDAHULUAN

Teknologi FIV terdiri dari serangkaian kegiatan yang meliputi pematangan dan fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio *in vitro*. Penerapan teknologi ini telah berhasil dilakukan pada berbagai spesies seperti sapi dan kerbau (Totey, *et al.*, 1993), kambing (Holmita, *et al.*, 1997), dan domba (Jaswandi, 2001 dan Brown, *et al.*, 1998), serta beberapa spesies hewan liar.

Melalui FIV potensi hewan yang dipotong masih dapat dimanfaatkan melalui penggunaan oosit dan spermanya untuk produksi embrio. Sehingga pengurangan populasi akibat pemotongan yang tinggi dapat dikurangi. Namun demikian penelitian-penelitian terhadap penerapan teknologi ini pada ternak sapi Pesisir masih sangat terbatas. Pada penelitian sebelumnya diperoleh bahwa sapi Pesisir mempunyai potensi oosit yang cukup baik bagi penerapan produksi embrio *in vitro*. Rata-rata oosit yang diperoleh berkisar 8 – 10 oosit per ovarium. Tingkat kematangan *in vitro* oosit sapi Pesisir adalah 59 % (Mundana dan Jaswandi, 2001).

Proses inkubasi dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa medium FIV seperti Brakett-Oliphant (B-O), modifikasi B-O dan TALP solution. Penelitian pada domba menunjukkan bahwa inkubasi yang lebih lama mendorong sperma mengalami aglutinasi (Jaswandi, 2001).

TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui pengaruh medium dan waktu inkubasi untuk proses kapasitasi sperma *in vitro* terhadap viabilitas sperma seperti persentase hidup motilitas, keutuhan membran plasma dan abnormalitas.
2. Mendapatkan medium dan waktu inkubasi terbaik untuk proses kapasitasi sperma dalam pelaksanaan fertilisasi *in vitro*
3. Mengetahui tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada sapi Pesisir.

METODE PENELITIAN

1. Materi Penelitian

Bahan bahan yang digunakan adalah:

1. Epididimis sebagai sumber sperma dan ovarium sebagai sumber oosit yang digunakan diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH).
2. Bahan kimia utama habis terpakai yaitu NaCl fisiologis, Phosphat Buffer Saline (PBS, Nissui, Japan), tissue culture medium-199 (TCM-199; Sigma, M-5017), Cow's Serum, medium Bracket-Oliphant (B-O)¹ (Bracket dan Oliphant, 1985) modified B-O¹ (Jaswandi *et al.*, 1992), Tyrode's Albumin Lactat Pyruvat solution (TALP)¹ (Parrish-Suko, 1975), Hapes (H-1617, Sigma), streptomisin dan penisilin, deionized water, alkohol, giemsa dan tissue.
3. Alat-alat utama yang digunakan adalah, tube 15 ml, pipet Pasteur, disposable syringe, filter Millipore, inkubator, timbangan listrik, oven, laminar flow, mikroskop, pipet eppendorf, sentrifuse, objek dan cover glass.

2. Metode Penelitian

Koleksi epididimis sapi Pesisir

Epididimis sapi Pesisir yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) di Kodya Padang, dan dibawa kelabotorium dalam medium Na Cl fisiologis psds suhu 37 °C.

Sperma diambil dari bagian korpus epididimis dengan memasukkan pengencer kedalam bagian epididimis tersebut dan kedua ujung epididimis diikat sedemikian rupa sehingga cairan tidak dapat keluar. Ejakulat dari bagian korpus kemudian ditoreh dan sperma yang telah bercampur dengan media dipencet keluar.

¹ Komposisi masing-masing medium terlampir

Kapasitasi In Vitro

Ejakulat sperma dari epididimis yang diperoleh diencerkan sampai 6 ml dengan tiga macam medium yaitu medium pencuci B-O (Bracket-Oliphant, 1987), modified B-O (Jaswandi *et al.*, 2001) dan TALPS (Parrish dan Suko, 1986).

Ketiga macam medium disuplementasi dengan 10 mM caffeine-sodium benzoat (Sigma, C-4144), 100 µg/ml streptomisin dan 100 IU/ml penicillin. Sperma dalam ketiga medium disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Endapan yang diperoleh diencerkan sampai konsentrasi 10×10^6 sperm/ml dengan medium kapasitasasi B-O, mB-O dan TALPS. Ketiga macam medium disuplementasi dengan 5 mM caffeine-sodium benzoat (Sigma, C-4144), 20 µg/ml heparin, 10% Serum sapi estrus, Calf Serum, 100 µg/ml streptomisin dan 100 IU/ml penicillin. Sperma dalam ketiga macam medium kapasitasasi diinkubasi selama 4 periode waktu 0, 30, 60, 90, 120 menit.

Tabel 1. Bagan Perlakuan Kapasitas Sperma

Medium Kapasitasi	Waktu Kapasitas (Menit)				
	0	30	60	90	120
B-O	----	----	----	----	----
MB-O	----	----	----	----	----
TALPS	----	----	----	----	----

Fertilisasi In Vitro

Oosit yang akan difertilisasi dimatangkan menggunakan medium TCM-199 + Hepes 20 mM dalam straw dibawah dalam inkubator pada suhu 38,0 °C selama 24 jam (Jaswandi *et al.*, 2001). Oosit yang telah matang dicuci tiga kali dengan medium fertilisasi B-O atau mB-O untuk membuang sebagian sel-sel kumulusnya. Seperti halnya medium kapasitasasi, pH medium fertilisasi diatur dengan menambahkan NaOH 1 N sehingga dicapai

pH \pm 7,4. Sperma yang akan digunakan diencerkan sampai konsentrasi 5×10^6 sperma/ml dengan medium mB-O yang disuplementasi dengan *hemikalسيوم* (Sigma, L-4388) 7,7 mM. Setelah dicuci tiga kali oosit dipindahkan ke dalam medium yang mengandung sperma. Oosit dan sperma kemudian disedot ke dalam straw, setiap straw diisi 15 sampai 20 oosit. Posisi atau penempatan oosit dalam straw sama dengan pada proses pematangan. Fertilisasi oosit untuk ke tiga sistem inkubasi dilakukan pada suhu $38,5^{\circ}\text{C}$.

Evaluasi

Evaluasi persentase hidup, motilitas dan abnormalitas dilakukan menurut prosedur yang telah baku di laboratorium. Untuk menentukan persentase hidup dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin. Sperma yang ditambah dengan pewarna eosin diulas pada gelas objek lalu dikering udara atau dengan pemanasan. Sperma yang hidup ditandai warna kepala yang terang dan sperma yang mati ditandai warna kepala yang merah atau banyak menyerap warna. Pengamatan dilakukan terhadap 200 sperma dengan skala 0 sampai 100 persen. Persentase motilitas dilakukan menggunakan haemositometer. Jumlah sperma yang proresif atau bergerak kedepan dihitung dari 200 sperma dengan skala 0 sampai 100 persen.

Abnormalitas ditentukan berdasarkan kelainan bentuk sperma yang diamati dari 200 sperma dengan skala 0 sampai 100 persen. Abnormalitas meliputi ekor yang bercabang atau mempunyai droplet.

Persentase sperma yang mengalami aglutinasi dihitung berdasarkan jumlah sperma yang mengalami aglutinasi (*head to head agglutination*) per seratus sperma.

Keberhasilan fertilisasi dievaluasi berdasarkan keberadaan pronukleus (1 PN, 2 PN dan >2 PN) yang diamati dengan metode pewarnaan aceto orcein. Oosit hasil fertilisasi dari masing-masing sistem inkubasi dibersihkan dari sisa sperma yang menempel, selanjutnya

diwarnai menurut prosedur yang sama dengan pewarnaan pada evaluasi pematangan oosit. Oosit dikategorikan terfertilisasi apabila mempunyai dua buah atau lebih pronuklei (2 PN dan >2 PN).

Peubah yang Diamati

1. Persentase hidup, motilitas, dan aglutinasi sperma pada masing-masing perlakuan medium kapasitasasi *in vitro*.
2. Persentase sperma hidup, motilitas, dan aglutinasi sperma pada masing-masing perlakuan waktu kapasitasasi *in vitro* perlakuan.
3. Interaksi antara medium yang digunakan dengan waktu kapasitasasi sperma terhadap persentase hidup, motilitas, dan aglutinasi sperma.
4. Karakteristik sperma epididimis sapi Pesisir yang meliputi motilitas, konsentrasi dan abnormalitas sperma.
5. Tingkat fertilisasi *in vitro* pada sapi Pesisir

Analisis Data

Data persentase hidup, motilitas sperma, dan aglutinasi sperma diolah secara statistik dengan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 5 x 3 (5 periode waktu dan 3 macam medium) menurut prosedur Steel dan Torrie (1984).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Sperma

Karakteristik merupakan salah satu pendekatan untuk mengetahui fertilitas semen atau sperma yang akan membuahi oosit baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Karakteristik

sperma yang diamati setelah mengalami perlakuan preinkubasi pada fertilisasi *in vitro* meliputi sperma hidup, motilitas, dan aglutinasi.

a. Karakteristik Sperma Sapi Pesisir

Hasil pengamatan terhadap beberapa karakteristik sperma dari epididmis Sapi Pesisir dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik sperma epididmis sapi Pesisir

No.	Karakteristik	%
1.	Motilitas	69.12
2.	Persentase Hidup	74.16
3.	Abnormalitas	7.03
4.	PH	6,8
5.	Konsentrasi (ml)	500×10^6
6.	Gerakan massa	++ -+++

Berdasarkan parameter karakteristik sperma sapi Pesisir di atas dapat dikatakan bahwa sperma tersebut tergolong baik. Hal ini didasarkan tingkat motilitas, persentase hidup dan abnormalitas yang relatif bagus. Menurut Toelihere (1985) dan Partodihardjo (1992) semen yang layak digunakan untuk mengawinkan ternak adalah semen yang mempunyai motilitas diatas 50 % dan tingkat abnormalitas kurang dari 20 %.

b. Persentase Sperma Hidup

Persentase sperma hidup setelah mengalami preinkubasi selama 0, 30, 60, 90 dan 120 menit dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase sperma hidup dalam medium B-O, mBO dan TALPS setelah mengalami preinkubasi pada berbagai periode waktu.

Medium	Waktu Preinkubasi (menit)					Rata-rata
	0	30	60	90	120	
B-O	74.00 ^{ab}	73.66 ^a	69.00 ^{bcd}	62.00 ^d	58.33 ^f	65.00
mB-O	78.00	79.00 ^a	77.00 ^a	75.33 ^b	65.33 ^d	74.93
TALPS	73.00 ^{abc}	76.33 ^a	71.00 ^{bcd}	71.33 ^{bcd}	67.33 ^{cd}	74.00
Rata-rata	78.44	76.33	72.55	69.55	59.66	

Huruf yang berbeda pada kolom atau baris menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat interaksi ($P < 0.05$) antara medium dan waktu preinkubasi terhadap persentase sperma hidup. Data penelitian pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa waktu pre inkubasi 3 menit memberikan persentase hidup tertinggi pada ketiga macam medium yang digunakan pada kedua sistem inkubasi. Pada medium B-O yang digunakan pada sistem inkubasi CO_2 5% persentase sperma hidup selama 60 menit nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan waktu lain. Sedangkan pada medium mB-O pada sistem inkubasi tanpa CO_2 5% persentase sperma hidup pada preinkubasi 60 menit tidak menunjukkan perbedaan dengan waktu preinkubasi 30 menit. Sebaliknya dalam medium TALPS persentase tertinggi diperoleh pada preinkubasi 30 menit. Hal ini berarti bahwa proses pre inkubasi pada sistem tanpa CO_2 5% menggunakan medium B-O dapat dilakukan selama 30–60 menit dan TALPS 30 menit. Perbedaan periode preinkubasi ini diduga karena medium medium mBO diperkaya dengan hemicalcium. Sehingga lebih cepat mendorong aktifitas sperma dengan demikian tidak terjadi perbedaan sperma hidup dalam kedua periode waktu. Peningkatan konsentrasi Ca^{++} dalam medium selain dapat meningkat memperpanjang daya hidup sperma (Byrd *et al* (1992)

c. Persentase Sperma Motil

Persentase sperma motil setelah mengalami periode preinkubasi selama 0, 30, 60, 90 dan 120 menit dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase sperma motil dalam medium B-O, mBO dan TALPS setelah mengalami preinkubasi pada berbagai periode waktu

Medium	Waktu Preinkubasi (menit)					Rata-rata
	0	30	60	90	120	
B-O	75.00	71.00	66.67	61.67	56.67	66.26 ^a
mB-O	73.33	70.00	68.33	70.00	63.33	69.00 ^a
TALPS	75.00	70.00	66.67	63.33	56.67	66.87 ^a
Rata-rata	74.44 ^a	70.44 ^{ab}	67.22 ^{bc}	65.00 ^c	58.89 ^d	

Huruf yang berbeda pada kolom atau baris menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05\%$).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu dari kedua sistem inkubasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$), sedangkan medium menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0.05$) terhadap persentase sperma motil. Disamping itu juga tidak terdapat interaksi ($P > 0.05$) antara waktu dan medium tersebut kedua sistem inkubasi tersebut. Data yang diperoleh menunjukkan semakin lama waktu pre inkubasi semakin menurun persentase sperma motil. Menurut Hafez (2000) motilitas yang tinggi akan berkurang dengan meningkatnya waktu karena sperma mulai kekurangan suplai energi. Ditambahkan Rice, et al (1957) bahwa ada beberapa faktor yang menyebabkan penurunan persentase daya hidup sperma diantara motilitas, semakin cepat motilitas semakin pendek dlam hidupnya. Pada Tabel 3 terlihat bahwa motilitas setelah preinkubasi 120 menit untuk ketiga medium masih diatas 50 %. Standar minimum motilitas untuk digunakan menurut Toelihere (1985) adalah 40%, sehingga semen dari semua perlakuan dalam penelitian ini masih layak untuk digunakan. Namun tingkat keberhasilan yang tinggi akan dicapai pada semen yang

mempunyai motilitas yang tinggi. Hasil ini juga menunjukkan bahwa medium mBO dan TALPS sama efektifitasnya untuk fertilisasi *in vitro*.

Dengan demikian untuk mendapatkan persentase keberhasilan fertilisasi yang tinggi, preinkubasi sperma secara *in vitro* dapat dilakukan selama 30 menit pada BO untuk sistem inkubasi CO₂ 5% dan medium mBO dan TALPS untuk sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%. De Smedt *et al.* (1992) melakukan preinkubasi sperma sebelum digunakan untuk fertilisasi oosit selama 4-6 jam dalam medium mBO yang tidak disuplementasi heparin dan caffeine. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa prosedur dalam penelitian ini dapat memperpendek waktu preinkubasi untuk sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% dan dapat menggunakan medium TALPS sebagai alternatif.

d. Persentase Sperma Aglutinasi.

Persentase sperma yang mengalami aglutinasi setelah perlakuan waktu preinkubasi dalam ke tiga macam medium data dilihat pada Tabel 3.

Tabel 4. Persentase sperma aglutinasi dalam medium B-O, mBO dan TALPS setelah mengalami preinkubasi pada berbagai periode waktu

Medium	Waktu Preinkubasi (menit)					Rata-rata
	0	30	60	90	120	
B-O	6.00	18.33	12.46	12.82	18.47	12.37 ^a
mB-O	6.33	14.00	16.83	1.59	18.87	14.64 ^b
TALPS	3.33	9.33	19	2.99	20	15.87 ^b
Rata-rata	5.22 ^a	13.87 ^b	16.1 ^{bc}	17.14 ^{cd}	19.11 ^d	

Huruf yang berbeda pada kolom atau baris menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P > 0.01\%$).

Persentase sperma yang mengalami aglutinasi meningkat selama periode preinkubasi secara sangat nyata ($P > 0.01$), selanjutnya diantara periode terlihat preinkubasi selama 30 menit tidak berbeda ($P > 0.05$) preinkubasi 60 menit, tapi lebih rendah ($P < 0.05$) dari periode 90 dan 120 menit. Persentase sperma aglutinasi dalam medium BO lebih

rendah dari dalam medium mBO dan TALPS karena kedua medium mBO dan TALPS juga sebagai akibat suplementasi hemicacium. Penambahan hemicalcium akan meningkatkan kandungan Ca^{++} ekstraseluler dari hemicalcium yang mendorong perubahan membran pada kepala sperma sehingga menyebabkan aglutinasi (Byrd *et al.*, 1986).

Tingkat aglutinasi dalam penelitian ini lebih tinggi dari yang dilaporkan De Smet *et al.* (1992), Le Gal 1996 dan Martino *et al.* (1995) yaitu 3-5 %. Perbedaan ini diduga disebabkan karena dalam penelitian ini medium selain disuplementasi dengan hemicalcium juga ditambah dengan caffeine dan heparin.

Sperma yang mengalami aglutinasi tidak dapat membuahi oosit, seperti yang dijelaskan Bearden dan Fuquay (1980) bahwa sperma rusak, cacat atau mengalami perubahan tidak akan sanggup melakukan fertilisasi. Apabila bentuk yang abnormal mencapai 20% atau lebih semen dianggap jelek (Toelihere, 1985). Pada ketiga medium dari kedua sistem inkubasi terlihat preinkubasi sampai 120 menit memberikan tingkat aglutinasi kurang dari 20 % sehingga dapat menjadi acuan dalam mempersiapkan sperma untuk fertilisasi *in vitro*. Berdasarkan hasil preinkubasi sebaiknya dilakukan dalam periode 30 menit saja.

e. Fertilisasi *in vitro*

Oosit hasil pematangan menurut metode terbaik untuk kedua sistem inkubasi pada penelitian tahap I, difertilisasi dengan berbagai periode waktu yaitu 6,12, 18 jam dalam tiga macam medium yaitu medium B-O untuk sistem inkubasi CO_2 5%, dan medium mBO dan TALPS untuk sistem inkubasi tanpa CO_2 5%. Evaluasi dilakukan dengan mengamati perkembangan inti yang dialami oleh oosit selama proses fertilisasi (Gambar 3).

Pengamatan terhadap oosit yang diinkubasi pada berbagai waktu fertilisasi untuk kedua sistem inkubasi dapat dilihat pada Tabel 5.

Meskipun terdapat kecenderungan tingkat fertilisasi pada sistem inkubasi CO₂ 5 % lebih tinggi dari kedua sistem lain, serta tingkat fertilisasi yang cenderung meningkat dengan bertambah lamanya inkubasi sperma dengan oosit, namun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) diantara perlakuan. Hal ini berarti potensi oosit terfertilisasi oleh sperma hampir sama pada kedua sistem inkubasi sehingga fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% atau baik menggunakan medium mBO maupun medium TALPS.

Tabel 5. Tingkat fertilisasi *in vitro* pada berbagai medium fertilisasi *in vitro* (%)

Ulangan	Medium Fertilisasi		
	B-O	MB-O	TALPS
1.	50.00	42.500	40.00
2	42.50	40.00	62.500
3	55.00	62.50	55.55
Rata rata	49.16 ^a	46.67 ^b	52.68 ^a

Huruf yang berbeda pada baris menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P>0.05\%$).

Hasil yang hampir sama diantara sistem inkubasi juga menunjukkan bahwa medium yang digunakan dapat memberikan kondisi yang optimal untuk fertilisasi oosit pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%. Meskipun terdapat perbedaan kecil dalam komposisi medium B-O (tanpa Hapes) dan medium mB-O (dengan Hapes), tetapi karakteristik medium seperti pH hampir sama. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Visconti *et al.* (1999) yang mendapatkan pola reaksi akrosom sperma sebagai salah satu proses biologis yang mempengaruhi keberhasilan fertilisasi dalam medium yang mengandung Hapes dan NaHCO₃ hampir sama dengan di dalam medium yang mengandung NaHCO₃ tanpa Hapes. Pada medium yang mengandung Hapes reaksi akrosom terjadi setelah tiga jam diinkubasi dan pada medium tanpa Hapes terjadi setelah empat jam diinkubasi.

Pada preinkubasi dan fertilisasi pH medium dipertahankan pada kisaran 7,4 – 7,6 dengan menyebarkan gas CO₂ 5% pada permukaan medium B-O selama 60 detik,

sedangkan pada medium mB-O pH medium dikontrol dengan menambahkan NaOH 1 N. Dengan demikian pH medium yang digunakan berada pada kisaran pH optimal untuk kapasitas yaitu 7,3 dan untuk fertilisasi adalah 7,7 (De Smedt et al., 1992). Menurut Parrish *et al.* (1989) proses kapasitas akan terhambat bila pH medium lebih rendah dari pH 7,0.

Dalam penelitian ini penggunaan prosedur preinkubasi dan penambahan kafein dan heparin dalam jumlah yang sama baik pada medium B-O, mBO maupun TALPS untuk mendorong kapasitas dan reaksi akrosom juga memberikan kontribusi terhadap hasil fertilisasi yang hampir sama diantara perlakuan inkubasi. Penambahan heparin dalam medium fertilisasi akan meningkatkan tingkat fertilisasi oosit, disamping itu juga meningkatkan kemampuan oosit untuk mencapai tahap pembelahan (Parrish *et al.*, 1989). Hasil yang hampir sama diantara kedua sistem inkubasi juga disebabkan karena karakteristik sperma yang digunakan dalam membuahi oosit tidak menunjukkan perbedaan nyata baik motilitas, persentase sperma hidup maupun tingkat aglutinasi.

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini lebih rendah dari yang dilaporkan Boediono *et al* (2003). Dalam penelitian mereka didapatkan persentase pronukleus II yang terbentuk pada pembuahan fertilisasi oosit sapi perah mencapai 80%. Sedangkan Jaswandi (2001) mendapatkan tingkat fertilisasi antara 46 –52 % pada domba. Variasi hasil yang diperoleh dengan hasil penelitian lain dapat disebabkan karena pengaruh spesies hewan sumber oosit maupun sperma , prosedur fertilisasi maupun pematangan oosit dan factor lingkungan seperti sistem inkubasi (Gordon, 1994).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dalam penelitian ini maka dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut: Periode pre inkubasi sperma selama 30 menit memberikan hasil terbaik, baik untuk medium BO pada sistem inkubasi CO₂ 5% maupun pada medium mBO dan TALPS pada inkubasi tanpa CO₂ 5%. Medium modifikasi BO (mBO) dan TALPS memperlihatkan efektifitas yang untuk digunakan dalam proses fertilisasi sebagai mana terlihat dari karakteristik sperma, maupun tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden, H.J. dan J.W. Fuquay. 1980. Applied Reproduction. Reston Publishing Company Inc. Prentice Hall Company. Reston Virginia.
- Boediono, A., Suzuki T., dan R.A. Godke. 2003. Comparison of Hybrid and Pure Breed In Vitro Derived Cattles Embryos During In Vitro Culture. *Anim Reprod. Sci.* 78:1-11.
- Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of Rabbit Spermatozoa in Vitro. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
- Byrd, S.R. G. Flores-foxworth and M.E. Westhusin. 1995. Normal ovine embryos development following in vitro oocyte maturation in a portable inkubator in the absence of CO₂. *Theriogenology.* 45:179
- De Smedt, V., N. Crozt, M. Ahmed Ali, A. Martino and Y. Cognic. 1992. In Vitro Maturation and Fertilization of Goat Oocytes. *Theriogenology.* 37:1049-1060.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. *Biotechnology in Agricultural Series.* CAB. Int.
- Hafez, B., and E.S.E. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animal. 7th edition. Lea Febiger.
- Jaswandi. 2001. Kualitas dan Angka Maturasi in Vitro Oosit Domba pada Berbagai Suhu dan Waktu Penyimpanan Ovarium. Laporan Penelitian Dosen Muda. BBI. Dikti.
- Jaswandi, A. Boediono, dan M.A. Setiadi. 2001. IN Vitro Maturation and Fertilization of Sheep Oocytes in Absences CO₂. *Reprotech Journal.* 1:56-60.
- Le Gal, F. 1996. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 45:1147-1185.
- Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo and M.T. Paramio. 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goats oocytes. *Theriogenology.* 43: 473-485
- Mundana, M. dan Jaswandi. 2001. Potensi dan Viabilitas Oosit sapi Pesisir untuk Produksi Embrio in Vitro. Laporan Penelitian Dosen Muda. BBI Dukti.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N.L. First. 1989. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory effect of Glucose and Role of Intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41:683-699.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1984. Prosedur dan Metode Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa B. Soemantri. Gramedia. Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Cetakan Ke-3. Angkasa Bandung.

Totey, S.M., C.H., Pawshe and G.P. Singh. 1993. In Vitro Maturation and Fertilization of Buffalo Oocytes: Effects of Media Hormon and Sera. *Theriogenology*. 39:1153-1171.