

# TINGKAT PENETRASI DAN PERUBAHAN MORFOLOGI SPERMA PADA FERTILISASI OOSIT *IN VITRO* DENGAN SISTEM INKUBASI TANPA CO<sub>2</sub> 5%<sup>1</sup>

JASWANDI<sup>2</sup>

## Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat penetrasi sperma dan perubahan morfologi sperma pada fertilisasi *in vitro* menggunakan sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5%.

Pematangan *in vitro* oosit dilakukan dengan menggunakan medium TCM-199 untuk sistem inkubasi CO<sub>2</sub> 5% (kontrol) dan TCM-199 yang mengandung Hepes 20 mM untuk sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5%. Pematangan dilakukan selama 24 jam pada suhu 39°C. Oosit yang telah matang dengan masing-masing sistem inkubasi difertilisasi selama 6 jam dalam medium Bracket-Oliphant (kontrol) dan modified B-O untuk sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5%. Tingkat penetrasi dan perubahan morfologi sperma diamati dengan bantuan pewarnaanorcein. Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan analisis Chi-Square (Steel dan Torrie, 1984).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat penetrasi dan perubahan morfologi pada sistem inkubasi tersebut tidak berbeda dengan sistem inkubasi CO<sub>2</sub> 5% ( $P > 0.05$ ). Tingkat penetrasi sperma pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dan CO<sub>2</sub> 5% masing-masing adalah 95.24% dan 88.89%, persentase oosit yang mengalami kondensasi 76.19 dan 77.78%, dekondensasi 57.14 dan 55.56 serta persentase PN jantan masing-masing adalah 52.38 dan 55.56%. Sedangkan tingkat polispermia pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dan CO<sub>2</sub> 5% masing-masing adalah 28.57% dan 22.22%.

Dapat disimpulkan bahwa penggunaan sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dalam fertilisasi *in vitro* tidak mempengaruhi kemampuan penetrasi sperma pada oosit dan perubahan morfologi sperma dan dapat digunakan dalam produksi embrio *in vitro*.

Kata kunci : sistem inkubasi, fertilisasi *in vitro*, sperma

---

<sup>1</sup> Penelitian Dokter Muda dibiayai oleh dana Rutin Universitas Andalas tahun 2003.

<sup>2</sup> Staf pengajar Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas.

## PENDAHULUAN

Teknologi FIV merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan (media di luar tubuh). 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. Disamping itu FIV juga membuka peluang yang lebih besar dalam mengembangkan teknik rekayasa embrio lainnya seperti embrio sexing, kimera, partenogenesis dan kloning dengan menyediakan embrio dalam jumlah banyak dan murah. Penerapan teknologi ini telah berhasil dilakukan pada berbagai spesies seperti sapi (Trounson, *et al.* 1994), kerbau (Totey, *et al.* 1993), domba (Jaswandi 2002 dan Brown, *et al.*, 1998) kambing (Pawshc, *et al.* 1994) dan pada hewan liar seperti kucing, anjing dan cheetah (Beveridge dan Jabtour, 1998). Produksi embrio *in vitro* terdiri serangkaian kegiatan meliputi maturasi oosit, fertilisasi dan kultur embrio.

Keberhasilan Fertilisasi *in vitro* atau FIV ditentukan oleh kualitas oosit dan sperma. Sperma sebelum membuahi oosit akan mengalami berbagai perubahan morfologi dan fisiologi. Laju perubahan tersebut dipengaruhi oleh kondisi medium dan sistem inkubasi yang digunakan. Hasil penelitian pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5 % menunjukkan tingkat fertilisasi yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan menggunakan sistem inkubasi CO<sub>2</sub> 5%, tetapi persentase oosit yang mempunyai Pronukleus I (PN I) sedikit lebih tinggi pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% (Jaswandi, *et al.*, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar zigot tertahan perkembangannya pada tahap ini.

Berdasarkan uraian diatas telah dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui berbagai perubahan yang dialami sperma dalam proses fertilisasi *in vitro*, dengan harapan dapat dijadikan acuan untuk mengembangkan dan meningkatkan keberhasilan sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5%

## METODE PENELITIAN

### *Koleksi oosit*

Ovarium dari Rumah Potong Hewan dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi media NaCl fisiologis (0,9%) pada temperatur 35 °C. Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara menyayat (*slicing*) ovarium dalam cawan petri berisi medium Phosphat Buffer Saline (PBS; Nissui Japan) yang disuplementasi dengan *Calf Serum* (CS; Sigma) 10% dan gentamisin (Sigma, G-1397) 50 µg/ml, dan oosit yang terlepas diamati di bawah mikroskop. Oosit yang digunakan dalam pematangan adalah oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus kompak dan mempunyai sitoplasma yang homogen.

### *Pematangan oosit in vitro*

Perlakuan pematangan oosit adalah jumlah oosit dalam straw atau drop yaitu 10, 20 dan 30 oosit dan konsentrasi Hepes (Sigma, H-1617) yaitu 0 mM, 10 mM dan 20 mM dalam medium pematangan TCM-199 (TCM-199, Sigma, M-5017). Semua medium disuplementasi dengan FSH (FSH; Sigma) 10 µg/ml, *Calf Serum* (CS) 10% dan gentamisin 50 µg/ml.

Prosedur pematangan oosit dalam straw dilakukan menurut prosedur yang dikemukakan oleh Jaswandi (2000). Oosit yang diperoleh dicuci 3 kali dalam medium PBS dan dilanjutkan dalam medium pematangan. Oosit dengan jumlah 20-30 dimasukkan ke dalam 300 µl mikrodrip TCM-199 pada petridis atau ke dalam medium TCM-199 yang ditambah Hepes 20 mM pada straw. Semua medium disuplementasi dengan FSH (FSH; Sigma) 10 µg/ml, *Calf Serum* (CS) 10% dan gentamisin 50 µg/ml. Posisi medium dan oosit dalam straw berturut-turut adalah medium (2 cm), udara (0,5 cm), medium berisi oosit (3 cm), udara (0,5 cm) dan medium (2 cm). Kedua ujung dari straw kemudian dijepit dengan pinset panas. Straw dan mikrodrip yang berisi oosit diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada temperatur 39 °C. Masing-masing perlakuan jumlah oosit dan konsentrasi Hepes diulang 3 kali (3 straw untuk setiap unit eksperimen).

### *Fertilisasi in vitro.*

Oosit yang telah matang difertilisasi dengan sperma segar yang diperoleh dari seekor pejantan dengan bantuan vagina buatan. Pencucian sperma dengan plasma semen dilakukan dengan cara sentrifugasi 100  $\mu$ l semen dalam medium (Bracket-Oliphant, 1975) dan medium modified B-O (129.5 mM NaCl, 10 mM Hepes dan 4.16 mM NaHCO<sub>3</sub>). Kedua medium disuplementasi dengan 10 mM caffeine-sodium benzoat (Sigma, C-4144). Setelah bagian supernatan dibuang, di atas endapan sperma dilapiskan 2 ml medium B-O atau mB-O yang telah ditambah 5 % CS. Sperma dibiarkan melakukan *swim-up* selama 30 menit pada suhu 38.5°C. Sebanyak 0.5 ml bagian atas medium dipisahkan, selanjutnya diencerkan sampai mengandung sperma 1 x 10<sup>6</sup> sperma/ml. Inseminasi dilakukan dengan cara menambahkan 50  $\mu$ l sperma ke dalam 50  $\mu$ l medium fertilisasi B-O pada cawan Petri atau mB-O pada straw, yang berisi 20 oosit matang. Inseminasi dilakukan selama 6 jam pada suhu 38.5°C dalam inkubator.

### *Evaluasi Tingkat Pematangan*

Oosit yang telah difertilisasi dibersihkan dari sisa sperma yang masih menempel dengan memipet beberapa kali dalam medium PBS yang mengandung hyaluronidase 1%. Oosit yang telah gundul difiksasi selama 48 jam dalam larutan alkohol absolut : asetat glacial (3:1). Oosit selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan orcein (Sigma, O-7380) 1% selama 10 menit lalu dicuci dengan gliserol asetat dan dikeringkan. Status inti oosit ditentukan dengan mengamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10. Peubah yang diamati adalah tingkat penetrasi sperma, kondensasi dan dekodensasi sperma, pembentukan ProNukleus jantan dan tingkat polispermia. Data diolah secara statistik menggunakan analisis Chi-Square menurut prosedur Steel dan Torric (1984).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tingkat Penetrasi Sperma pada Oosit

Tingkat penetrasi sperma ke dalam oosit setelah diinkubasi selama 6 jam pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dan sistem inkubasi CO<sub>2</sub> 5% masing-masing adalah 95.24 dan 88.89 % (Tabel 1). Pada sapi penetrasi sperma ke dalam oosit mulai terjadi 2 jam setelah fertilisasi (14.1%) dan secara perlahan meningkat sampai 60 % setelah 5 jam dan mencapai 90.3 % setelah 8 jam (Djati, 1999). Peneliti lain mendapat tingkat penetrasi sperma setelah 6 jam inkubasi dengan oosit adalah 63.3% (Dode, 2002).

Tabel 1. Tingkat Penetrasi dan Perubahan Morfologi Sperma

Sistim Inkubasi	Tingkat Penetrasi	Sperma Kondensasi	Sperma Dekondensasi	Pronukleus Jantan	Polispermia
Tanpa CO <sub>2</sub>	95.24 <sup>a</sup>	76.19 <sup>b</sup>	57.14 <sup>e</sup>	52.38 <sup>ii</sup>	28.57 <sup>e</sup>
CO <sub>2</sub>	88.89 <sup>a</sup>	77.78 <sup>b</sup>	55.56 <sup>e</sup>	55.56 <sup>d</sup>	22.22 <sup>e</sup>

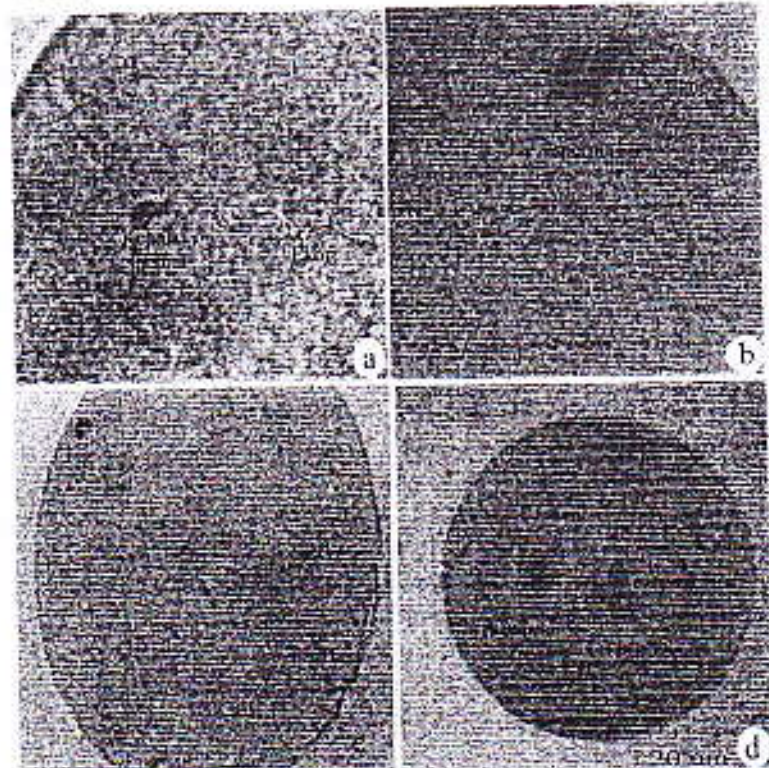
Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0.05)

Secara statistik tingkat penetrasi sperma pada kedua sistem inkubasi tidak berbeda nyata (P > 0.05). Hasil ini menunjukkan bahwa kemampuan sperma penetrasi tidak dipengaruhi oleh kondisi inkubasi. Kondisi pH medium yang hampir sama yaitu 7.0 – 7.3 merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi tingkat penetrasi sperma. Hal ini membuktikan bahwa penambahan Hepes 10mM dalam medium mB-O cukup efektif untuk mempertahankan pH pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5%. Kemampuan penetrasi yang hampir sama juga disebabkan karena medium yang digunakan sama-sama disuplementasi dengan caffeine dan heparin. Penambahan caffeine dan heparin secara bersamaan akan meningkatkan motilitas sperma dan kemampuan penetrasi sperma ke dalam oosit (Niwa *et al.*, 1992). Hal ini juga ditegaskan Coscioni *et al.*, (2001) bahwa kapasitas sperma dalam medium yang mengandung caffeine lebih tinggi dibandingkan medium tanpa caffeine. Kapasitas

merupakan salah satu proses biologis yang dialami sperma sebelum membuahi oosit (Yanagimachi, 1994).

#### Perubahan Morfologi Sperma Selama Fertilisasi.

Perubahan fisiologi sperma selama proses fertilisasi juga diikuti oleh perubahan morfologi seperti kondensasi, dekondensasi dan pembentukan pronukleus jantan (PN jantan). Persentase sperma yang mengalami kondensasi, dekondensasi dan membentuk PN jantan pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% berturut-turut adalah 76.19, 57.14 dan 52.38%, sedangkan pada sistem inkubasi dengan CO<sub>2</sub> 5% berturut-turut adalah 77.78, 55.56 dan 61.11 % (Tabel 1). Perubahan morfologi sperma untuk ketiga peubah diantara kedua sistem inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0.05$ ).



Gambar 1. Perubahan morfologi sperma selama fertilisasi (a. sperma kondensasi, b. sperma dekondensasi, c. sperma polispermia dan d. oosit yang mempunyai PN jantan dan betina).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan persentase oosit yang berkembang dengan semakin meningkatnya tahap perkembangan zigot pada kedua sistem inkubasi. Kegagalan fertilisasi pada oosit matang (M II) diantaranya disebabkan kegagalan sperma mengalami dekondensasi (11%) (Flaherty *et al.*, 1995)

Dekondensasi sperma terjadi ketika proses granulasi terjadi yaitu 2 jam setelah mencapai sitoplasma oosit (Dorsorsevt *et al.*, 1995). Dekondensasi diikuti oleh pembentukan PN betina, dan PN jantan dilaporkan terbentuk setelah pembentukan PN betina (Payne *et al.*, 1997). Kegagalan pembentukan PN jantan lebih banyak dipengaruhi oleh karena sperma tetap utuh atau mengalami dekondensasi tidak sempurna dibanding dengan pengaruh kegagalan aktivasi oosit (Goud *et al.*, 1998).

Persentase PN jantan yang terbentuk dalam penelitian ini tergolong tinggi. Dalam laporan yang lain dikemukakan bahwa tingkat pembentukan PN hasil fertilisasi *in vitro* adalah 44.44 % pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dan 51.83 % pada sistem inkubasi dengan CO<sub>2</sub> 5% (Jaswandi, 2002). Persentase PN jantan yang hampir sama disebabkan tingkat pematangan diantara kedua sistem inkubasi tidak berbeda (Jaswandi, *et al.*, 2001).

Pembentukan PN jantan hanya terjadi pada oosit yang telah matang, hal ini berkaitan dengan kadar glutathione. Konsentrasi glutathione dalam oosit selama pematangan dan fertilisasi mengalami perubahan dan sintesis glutathione selama pematangan adalah suatu faktor penting untuk mendorong kemampuannya membentuk PN jantan (Yoshida *et al.*, 1993). Dalam sitoplasma oosit matang hasil *in vivo* maupun *in vitro*, kandungan glutathione mencapai 2.2 pmol dan yang tidak matang 1.0 pmol. Proses kondensasi dan dekondensasi sperma dapat terjadi pada oosit tahap *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD) dan *Metaphase I* (Kang *et al.*, 2001). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dapat digunakan sebagai sistem inkubasi dalam produksi embrio *in vitro*.

### **Tingkat Polispermia**

Tingkat polispermia pada oosit yang diinkubasi pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% adalah 28.57 % dan pada sistem inkubasi dengan CO<sub>2</sub> 5 % yaitu 22.22%

### Tingkat Polispermia

Tingkat polispermia pada oosit yang diinkubasi pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% adalah 28.57 % dan pada sistem inkubasi dengan CO<sub>2</sub> 5 % yaitu 22.22% (P<0.05). Tingkat polispermia pada sistem inkubasi dalam penelitian ini lebih tinggi dari yang dilaporkan Jaswandi (2002) yang berkisar 0-20%. Tingkat polispermia yang cukup tinggi diduga disebabkan oleh pengaruh penambahan caffeine dan heparin. Penambahan kedua suplemen akan mempercepat proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Coscioni *et al.*, 2001) dan meningkatkan pergerakan sperma (Niwa *et al.*, 1992). Keadaan ini diduga dapat menyebabkan mekanisme yang menghambat masuknya sperma berikutnya setelah sperma pertama masuk atau yang dikenal dengan reaksi zona pelusida maupun vitellin blok menjadi tidak efektif. Permulaan blok dimulai ketika sperma pertama masuk ke dalam sitoplasma dan secara bersamaan kortikal granul dilepaskan ke ruang peri vitellin. Pelepasan kortikal granul mendorong pelepasan enzim yang menyebabkan pengerasan zona pelusida dan *in aktivasi reseptor* (ZP3) pengikat sperma (Yangimachi, 1994).

### KESIMPULAN

1. Penggunaan sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dalam fertilisasi *in vitro* tidak mempengaruhi kemampuan penetrasi sperma pada oosit dan perubahan morfologi sperma
2. Tingkat penetrasi sperma pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% mencapai 95.24% dan pada inkubasi CO<sub>2</sub> 5% 88.89%, persentase oosit yang mengalami kondensasi dekontensasi, serta mempunyai PN jantan pada sistem inkubasi tanpa CO<sub>2</sub> 5% dan CO<sub>2</sub> 5% masing-masing adalah 76.19 dan 77.8%, 57.14 dan 55.56; dan 52.38 dan 55.56%. Sedangkan tingkat polispermia adalah 28.57% dan 22.22%



## Daftar Pustaka

- Beveridge, D.R. and H. N. Jabtour. 1998. Potential of assisted technique for the conservation of endangered species in captive. *Vet. Rec.* 143 :159
- Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Brown, B.W. and T. Radziewicz. 1998. Production of sheep embryos *in vitro* fertilization and development of progeny following single and twin embryos transfer. *Theriogenology* 49: 1525-1537.
- Coscioni, A.C. H.D. Reichbach, J. Schwartz, V.S.N. La Falci, J.L. Rodrigues and A. Brandelli. 2001. Sperm function and production of bovine embryos *in vitro* after swimp-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 67:59-67
- 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.
- Dode, M.A.N., N.C. Rodovalho, V.G. Ueno and C.E. Fernandes. 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of bos indicus oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 69:15-23
- Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. 1995. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995 11:3012-7.
- Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. 1995. Actiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 10:2623-9
- Goud P.T., A. P. Goud, A. V. Rybouchkin, P. De Sutter and M. Dhont. 1998. Chromatin decondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes. *Human Reproduction.* 13: 1336-1345
- Hee G. K., T. J. Kim, H. J. Bae, H. J. Moon, H. J. Lee, H. Young, Yang and M. K. Kim. 2001. A Study on the Decondensation and Pronucleus Formation of Sperm Nucleus in the Mouse Oocyte. *J. Biomed. Lab. Sci.* 7 : 173-179

- Jaswandi, M. A. Setiadi and A. Boediono. 2001. *In vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes in absence CO<sub>2</sub>. *Reprotech* 1:19-21
- Jaswandi. 2002. Penggunaan Hepes dan Butiran Efervesen Dalam Sitem Inkubasi Pada Produksi Embrio Domba Secara *In Vitro*. Disertasi. Fakultas Pascasarjana. IPB.
- Niwa, K., O. Ogada and C. K. Park. 1992. Effect of glucose in medium with kafein and or heparin on *in vitro* penetration of bovine oocytes matured in cultured. *Proc. Twelfth Int. Cong. Anim Reprod.* (2):671-673. - -
- Payne D., S. P. Flaherty, M. F. Barry and C. D. Matthews. 1997. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction*. 12 :532-541.
- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 125-137.
- Yanagimachi, R. 1994. Mamalian Fertilization I. In E. Knobil and J.D. Neil (eds): *The Physiologi of Reproduction*. Raven Press. 2<sup>nd</sup> Ed. New York.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod.* 1:89-94