

# PERKEMBANGAN OOSIT KAMBING SETELAH MATURASI, FERTILISASI DAN KULTUR *IN VITRO*

DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF CAPRINE OOCYTE AFTER *IN VITRO* MATURATION, FERTILIZATION AND CULTURE

Arief Boediono<sup>1</sup>, Yohan Rusiyantono<sup>1</sup>, Kusdiantoro Mohamad<sup>1</sup>, Ita Djuwita<sup>1</sup>, dan Herliatien<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, INDONESIA.

<sup>2</sup>Balai Inseminasi Buatan Singosari, Malang, INDONESIA

\* Korespondensi

## ABSTRAK

*Media Veteriner*. 2000. 7(4):11-17.

Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur dievaluasi pada kondisi *in vitro*. Oosit dikoleksi dengan metode aspirasi folikel (diameter 2 sampai 5 mm) dan mencacah ovarium yang didapat dari rumah potong hewan. Oosit hasil koleksi diinkubasi dalam medium maturasi selama 18, 22, 26, atau 30 jam. Spermatozoa ejakulat dan beku-cair diamati viabilitasnya dalam media fertilisasi (Brackett and Oliphant medium, BO dan TCM-199) dengan cara menghitung konsentrasi spermatozoa yang hidup dan konsentrasi spermatozoa yang memiliki motilitas progresif pada 0, 3, 6 dan 24 jam inkubasi. Oosit hasil maturasi diinseminasi dengan spermatozoa ejakulat dengan konsentrasi akhir  $5 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Zigot dikultur dalam medium kultur untuk diamati perkembangan embrio selanjutnya. Koleksi oosit kambing dengan metode aspirasi folikel didapatkan 10 oosit per ovarium. Apabila setelah aspirasi dilanjutkan dengan mencacah ovarium didapatkan tambahan 8 oosit per ovarium. Tingkat maturasi oosit yang mencapai tahap metafase II adalah 36,59%, 78,26%, 88,00% dan 83,12% berturut-turut untuk periode maturasi 18, 22, 26 dan 30 jam. Data ini menunjukkan bahwa oosit kambing mencapai tahap metafase II setelah mengalami lebih dari 22 jam maturasi *in vitro*. Persentase spermatozoa hidup dari spermatozoa beku-cair pada 0 jam (48% dan 38% berturut-turut untuk media BO dan TCM-199) lebih rendah dibanding spermatozoa ejakulat (93% dan 88% berturut-turut untuk media BO dan TCM-199) pada waktu yang sama. Viabilitas dan motilitas progresif spermatozoa beku-cair menurun setelah 6 jam inkubasi dan mencapai nilai 0 pada 24 jam inkubasi. Sebaliknya viabilitas dan motilitas spermatozoa ejakulat mampu bertahan sampai 24 jam inkubasi. Perkembangan oosit hasil maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* menunjukkan tingkat pembelahan 47,00% dan 38,52% embrio mencapai tahap morula/blastosis. Hasil ini menunjukkan bahwa embrio kambing dapat dihasilkan melalui maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*.

**Kata-kata kunci:** oosit kambing, maturasi, fertilisasi, kultur, *in vitro*

## ABSTRACT

*Media Veteriner*. 2000. 7(4):11-17.

Developmental competence of caprine oocyte after *in vitro* maturation, fertilization and culture was evaluated in this study. Oocytes were collected from ovaries obtained from local slaughterhouse by aspiration of the follicles (2 to 5 mm diameters) followed by slicing the ovaries. Collected oocytes were incubated in maturation medium for 18, 22, 26 and 30 hours. The viability and motility of sperm (fresh and frozen-thawed) in fertilization media (Brackett and Oliphant medium, BO and TCM-199) were examined after 0, 3, 6 and 24 hours of incubation. Matured oocytes were fertilized with  $5 \times 10^6$  sperm per ml of fresh ejaculate for 18 hours followed by cultured *in vitro* for further development. Ten oocytes per ovary were collected from caprine ovary by aspiration method, and the additional 8 oocytes per ovary followed by slicing method. The maturation rates (metaphase II stage) were observed 36.59%, 78.26%, 88.00% and 83.12% after incubation for 18, 22, 26 and 30 hours, respectively. The viability of frozen-thawed sperm were lower than fresh ejaculate both in BO or TCM-199 media on 0 hour of incubation. The viability and progressive motility of frozen-thawed sperm were decreased after 6 hours of incubation and they were no sperm motil after 24 hours of incubation. However, the viability and progressive motility of fresh ejaculated sperm were maintained until 24 hours of incubation. Fertilized oocytes were developed to cleavage (47.00%) and morula/blastocyst (38.52%) stages after culture *in vitro*. These results show that caprine embryo could be produced after *in vitro* maturation, fertilization and culture.

**Key words:** caprine oocyte, maturation, fertilization, culture, *in vitro*

## PENDAHULUAN

Bioteknologi akhir-akhir ini menjadi topik ilmiah yang sangat penting. Di sub sektor peternakan saat ini, bioteknologi yang digunakan adalah Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE). Penerapan IB dan TE dari bibit unggul sementara ini diarahkan untuk memperbaiki

mutu genetik dan produktifitas sapi perah dan sapi potong. Namun demikian, untuk mensukseskan kegiatan tersebut sangat diperlukan dukungan penelitian dan pengembangan terpadu pada berbagai komoditi termasuk ternak ruminansia kecil.

Produksi dan transfer embrio secara *in vivo* pada ruminansia besar (sapi, kerbau) telah dilakukan dalam jumlah masal. Sementara keadaan ini masih sulit dilakukan pada ruminansia kecil (kambing, domba). Salah satu dari banyak faktor pembatas yang esensial pada koleksi dan transfer embrio pada ruminansia kecil adalah biaya yang mahal karena masih diperlukan perasat bedah dibandingkan dengan pada ruminansia besar yang bisa dilakukan tanpa bedah. Teknik fertilisasi *in vitro* merupakan alternatif untuk mendapatkan produksi embrio dengan biaya relatif murah. Selain itu keberhasilan fertilisasi *in vitro* ini memungkinkan majunya perkembangan ilmu pengetahuan dibidang bioteknologi reproduksi misalnya produksi embrio identik (Suzuki *et al.*, 1991) atau klonning dan tranfer genetik (Baguisi *et al.*, 1999).

Dengan kemajuan bioteknologi dibidang reproduksi, limbah rumah potong hewan khususnya hewan betina berupa ovarium sebagai sumber sel gamet betina (oosit) melalui suatu rekayasa bioteknologi dapat dimanfaatkan sehingga menjadi suatu produk yang sangat berharga berupa embrio. Hal tersebut dimungkinkan dengan penerapan teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) yang dilaksanakan melalui proses aspirasi dan maturasi sel telur, pembuahan dengan spermatozoa dan perkembangan embrio di luar tubuh hewan (Boediono dan Damayanti, 1996).

Telah banyak laboratorium yang berhasil memproduksi embrio sapi secara *in vitro* (Prokofiev *et al.*, 1992; Pinyopummintr and Bavister, 1991; Boediono *et al.*, 1994). Namun demikian informasi keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* pada kambing masih belum banyak. Sebagai upaya pengembangan teknologi produksi embrio kambing secara *in vitro*, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui: a) metode koleksi oosit untuk memanfaatkan limbah rumah potong hewan, b) viabilitas spermatozoa kambing pada kondisi *in vitro* dan c) tingkat pematangan, fertilisasi dan kemampuan berkembang oosit kambing pada kondisi *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu rangkaian proses biologi yang saling berkaitan satu sama lain. Rangkaian proses tersebut meliputi koleksi dan maturasi oosit, koleksi dan kapasitas spermatozoa, fertilisasi dan perkembangan embrio *in vitro*. Produksi embrio kambing secara *in vitro* dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Boediono *et al.* (1994) dengan beberapa modifikasi.

## Koleksi dan Maturasi Oosit

Ovari kambing diambil dari rumah potong hewan dalam medium NaCl fisiologis pada suhu 30°C. Koleksi oosit dilakukan dengan metode: a) aspirasi follikel berukuran diameter antara 2 sampai 5 mm menggunakan jarum berukuran 20G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang sebelumnya telah diisi 0,5 ml larutan modifikasi *phosphate buffered saline* (mPBS; Gibco, USA), dan b) mencacah ovarium (setelah dilakukan aspirasi) menggunakan pisau silet yang telah disterilisasi dengan sayatan berulang-ulang pada bagian korteks ovarium kemudian ovarium dicuci pada larutan mPBS. Oosit hasil koleksi kemudian dicuci beberapa kali dan dikultur *in vitro* dalam medium maturasi yang terdiri dari *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199; Sigma Chemical Co., USA) ditambahkan dengan serum kambing 10%, *follicle stimulating hormone* (FSH; Denka Pharmaceutical, Japan) 0,01 mg/ml dan gentamicin sulfat (Sigma Chemical Co., USA) 50 µg/ml. Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C dengan periode inkubasi yang berbeda (18, 22, 26 dan 30 jam). Untuk mengetahui kemampuan embrio berkembang pada tahap awal perkembangan, maturasi *in vitro* dilakukan dengan metode yang sama dengan periode waktu inkubasi selama 24 jam.

## Koleksi Spermatozoa dan Fertilisasi *In Vitro*

Spermatozoa yang digunakan untuk penelitian ini adalah spermatozoa ejakulat segar dan spermatozoa beku-cair. Spermatozoa ejakulat segar didapat dari seekor pejantan (2,5 tahun) dengan menggunakan vagina buatan. Sedangkan spermatozoa beku-cair didapatkan dari Balai Inseminasi Buatan Singosari hasil koleksi satu pejantan dari hasil produksi yang sama. Pencucian spermatozoa dilakukan dengan sentrifugasi sebanyak 2 kali masing-masing dengan kecepatan 500G selama 5 menit dalam dua larutan yang berbeda yaitu: a) Brackett dan Oliphant (BO; Brackett dan Oliphant, 1975) yang telah ditambahkan kafein 2,5 mM (Kaf-BO), dan b) TCM-199 yang telah ditambahkan HEPES 2,3 mg/ml dan kafein 2,5 mM (Younis, *et al.*, 1991). Spermatozoa hasil pencucian diencerkan dengan masing-masing media yang telah ditambahkan *bovine serum albumin* (BSA; Sigma Chemical Co., USA) 0,3% dan heparin (Shimizu Pahraceutical, Japan) 20 µg/ml sehingga konsentrasinya menjadi 5 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml. Inkubasi spermatozoa secara *in vitro* dilakukan selama 0, 3, 6 dan 24 jam.

Spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* adalah spermatozoa segar berasal dari ejakulat. Persiapan spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan pencucian seperti metode sebelumnya dalam medium BO dengan konsentrasi akhir 5 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml. Oosit yang telah matang, dicuci dalam medium fertilisasi sebanyak 3 kali kemudian dilakukan fertlisasi dalam medium drop/tetes sebanyak 100 µl berisi sebanyak 20-30

oosit per drop. Fertilisasi *in vitro* dilakukan selama 18 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 38.5°C.

#### Perkembangan Embrio *In Vitro*

Zigot hasil fertilisasi *in vitro* dicuci dari medium inseminasi untuk selanjutnya dilakukan kultur dalam medium kultur (TCM-199) dengan penambahan insulin (Wako Pure Chemical Industries, Japan) 5 µg/ml, gentamicin sulfat 50 µg/ml dan serum kambing sebanyak 10%. Kultur *in vitro* dilakukan dengan sistem kumulus sel ko-kultur (Goto *et al.*, 1988). Pengamatan dilakukan pada hari ke dua untuk menghitung tingkat perkembangan sampai tahap pembelahan dan sampai hari ke delapan untuk pengamatan tahap morula/blastosis.

#### Evaluasi

**Perwarnaan Pronukleus.** Pengamatan pronukleus untuk melihat status perkembangan oosit dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan metode pewarnaan Aceto-Orcein seperti yang dilaporkan oleh Boediono *et al.*, (1995). Untuk evaluasi status pronukleus sampel oosit diambil dari medium maturasi sesuai dengan periode maturasi (18, 22, 26 dan 30 jam) sedangkan untuk evaluasi keberhasilan pembuahan (fertilisasi) sampel oosit diambil 18 jam setelah periode inkubasi dengan spermatozoa. Sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet dengan diameter yang sesuai dengan diameter oosit atau dengan perendaman dalam medium yang mengandung hyaluronidase 150 U/ml. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus di fiksasi dalam asam asetat-alkohol 25% selama 72 jam, diwarnai dengan aceto-orcein 1% selama 10 menit dan dibersihkan dengan aceto-glycerol. Pengamatan pronukleus dilakukan menggunakan mikroskop fase kontras.

#### Pengamatan Spermatozoa Hidup dan Mati.

Viabilitas spermatozoa dievaluasi dengan perhitungan persentase spermatozoa hidup - mati dan konsentrasi spermatozoa yang bergerak secara progresif (motilitas spermatozoa progresif). Jumlah ratio sel hidup dan mati dilakukan dengan pewarnaan *diferensial fluorochrome* seperti yang telah dilaporkan oleh Handyside dan Hunter, (1984) dengan beberapa modifikasi. Spermatozoa dengan konsentrasi  $2 \times 10^6$  sel/ml diinkubasi dalam PBS yang mengandung propidium iodine (PI, 10 µg/ml) dan bis benzimide (10 µg/ml) selama 30 menit dalam inkubator 38,5°C. Setelah diinkubasi spermatozoa diulas pada gelas obyek, ditutup dengan penutup gelas obyek. Semua pengerjaan diusahakan sesedikit mungkin terkena cahaya terang, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop fluoresen. Inti dari sel yang hidup (bis benzimide-positif) akan mengambil warna biru sedangkan inti sel yang mati (PI-positif) akan mengambil warna pink.

#### Rancangan Penelitian

Tingkat kematangan (*maturiation rate*) oosit dievaluasi pada 326 oosit yang diinkubasi secara *in vitro* selama periode 18 jam (82 oosit), 22 jam (92 oosit), 26 jam (75 oosit) dan 30 jam (77 oosit). Pengamatan dilakukan sebanyak 7 kali ulangan untuk masing-masing periode inkubasi. Perhitungan persentase spermatozoa hidup dan mati dilakukan terhadap 200 spermatozoa pada masing-masing sampel dan dilakukan sebanyak dua kali pada sampel yang sama. Sedangkan perhitungan persentase motilitas progresif spermatozoa dilakukan dua kali pada masing-masing sampel. Pengamatan terhadap spermatozoa segar (asal ejakulat) dan sperma beku-cair dilakukan sebanyak 8 kali ulangan. Keberhasilan perkembangan embrio kambing melalui teknik maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* dilakukan sebanyak 8 kali ulangan dengan menggunakan total 452 oosit. Evaluasi tingkat kematangan dan keberhasilan pembuahan dilakukan dengan pengambilan sampel sebanyak lebih kurang 10% dari jumlah oosit yang digunakan pada setiap ulangan. Keberhasilan embrio membelah mencapai tahap 2 sampai 8 sel dan perkembangan mencapai morula/blastosis dihitung berdasarkan sisa oosit yang digunakan sampai tahap kultur *in vitro*.

Data diperoleh dengan rancangan acak lengkap (RAL) dan dianalisa menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA). Perbedaan yang ada diantara perlakuan dianalisa lebih lanjut dengan uji wilayah berganda Duncan.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

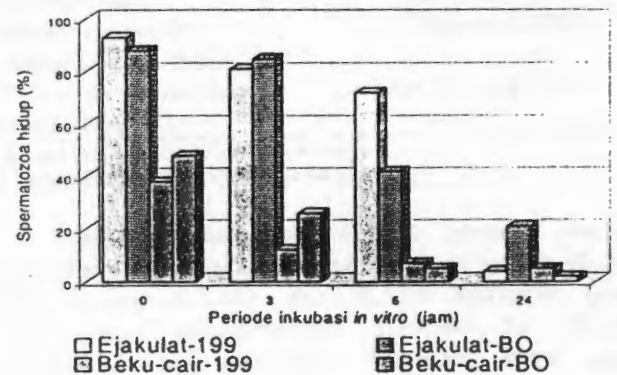
Koleksi oosit kambing pada ovarium menggunakan metode aspirasi rata-rata didapatkan sebanyak 10 oosit per ovarium. Jumlah tersebut lebih sedikit dibandingkan bila dilakukan dengan metode yang sama pada sapi (13 oosit per ovarium) seperti dilaporkan oleh Boediono dan Suzuki (1996). Usaha optimalisasi jumlah dapatan oosit dapat dilakukan dengan mencacah ovarium setelah aspirasi. Dengan metode mencacah didapatkan tambahan rata-rata sebanyak 8 oosit per ovarium. Pada kambing, oosit memulai proses meiosis pada saat folikel antral mencapai ukuran diameter 0,5 sampai 0,8 mm, selanjutnya akan berkembang mencapai tahap metafase I pada diameter 1,0 sampai 1,8 mm dan selanjutnya dimulai proses menuju metafase II pada perkembangan folikel yang lebih besar (De Smedt dkk., 1994).

Untuk keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro* diperlukan informasi mengenai waktu dan tingkat maturasi oosit mencapai tahap metafase II (M II) setelah dikultur secara *in vitro*. Seperti yang telah diketahui, fertilisasi hanya bisa terjadi pada oosit yang telah mencapai tahap M II. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa pada periode kultur 18 jam didapatkan oosit yang masih berada pada tahap *germinal vesicle* (GV: 9,76%; 8/82) ataupun *germinal vesicle break down* (GVBD: 23,17%; 19/82)

Tabel 1. Tingkat maturasi yang tinggi didapatkan setelah dilakukan kultur *in vitro* selama 22 jam (78,26%; 72/92), 26 jam (88,00%; 66/75) dan 30 jam (83,12%; 64/77). Untuk mendapatkan tingkat fertilisasi yang tinggi, beberapa peneliti melakukan inkubasi untuk maturasi oosit kambing secara *in vitro* selama 24 jam (Younis *et al.*, 1991; Pawshe *et al.*, 1996) sampai 27 jam (De Smedt *et al.*, 1992; Croset *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997). Hal menarik yang dapat dilihat dari proses maturasi oosit kambing secara *in vitro* adalah kejadian partenogenesis secara spontan (2,60%; 2/77) yang terjadi pada 30 jam inkubasi. Seperti dilaporkan pada sapi oleh Boediono *et al.* (1995), periode maturasi oosit yang terlalu panjang (*over maturation*) akan menyebabkan kejadian partenogenesis secara spontan.

Selain dari kemampuan oosit untuk dapat dibuahi oleh spermatozoa, kemampuan spermatozoa sendiri untuk hidup dan matang pada media *in vitro* juga sangat menentukan fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio tahap preimplantasi. Kemampuan spermatozoa segar (ejakulat) maupun beku-cair untuk dapat bertahan hidup pada media *in vitro* pada berbagai periode inkubasi dapat dilihat pada Gambar 1. Dengan menggunakan metode pewarnaan diferensial fluorochrome terlihat bahwa pada jam ke-0 (sesaat setelah penampungan untuk spermatozoa ejakulat atau pencairan untuk spermatozoa beku-cair) persentase hidup spermatozoa beku-cair hanya 38,78% pada medium TCM-199 dan 48,69% pada medium BO. Kondisi tersebut kurang sesuai bila spermatozoa beku-cair digunakan untuk fertilisasi *in vitro* karena sperma yang baik setidaknya mempunyai sekitar 70 sampai 80% spermatozoa hidup sebelum digunakan (Chemineau *et al.*, 1991). Pada inkubasi 3 jam, kemampuan hidup spermatozoa beku-cair menurun tajam (12,53% dan 26,73% pada medium TCM-199 dan medium BO) walaupun masih mampu bertahan sampai 24 jam dengan persentase yang sangat rendah (5,23% dan 2,64% pada medium TCM-199 dan medium BO). Keadaan tersebut berbeda dengan spermatozoa ejakulat yang mempunyai kemampuan hidup 93,02% pada medium TCM-199 dan 88,16% pada medium BO pada jam ke-0. Inkubasi *in vitro*

pada periode yang lebih panjang menunjukkan penurunan tetapi masih layak digunakan untuk fertilisasi *in vitro*. Sedangkan medium TCM-199 sebagai media fertilisasi menunjukkan persentase spermatozoa hidup yang masih tinggi sampai periode inkubasi 6 jam (72,06% dan 42,14% pada medium TCM-199 dan medium BO), namun spermatozoa tidak mampu hidup lebih lama dari 24 jam inkubasi *in vitro* pada medium TCM-199 (4,34%). Sedangkan pada medium BO, spermatozoa mampu bertahan hidup (21,05%) sampai 24 jam inkubasi *in vitro*.



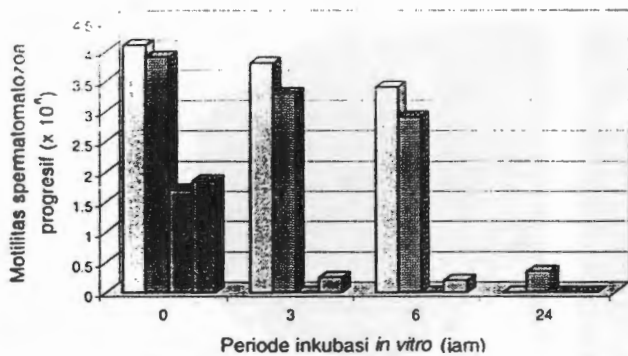
Gambar 1. Persentase (%) spermatozoa hidup pada media fertilisasi dan periode inkubasi yang berbeda.

Perhitungan konsentrasi spermatozoa dengan motilitas progresif menunjukkan bahwa motilitas progresif yang tinggi didapatkan pada 0 jam inkubasi spermatozoa ejakulat pada media fertilisasi TCM-199 ( $4,10 \times 10^6$  spermatozoa/ml) dan BO ( $3,90 \times 10^6$  spermatozoa/ml) (Gambar 2). Kondisi tersebut menunjukkan penurunan sampai pada periode inkubasi selama 6 jam ( $3,40 \times 10^6$  spermatozoa/ml pada medium TCM-199 dan  $2,90 \times 10^6$  spermatozoa/ml pada medium BO). Motilitas progresif spermatozoa dalam medium BO dapat bertahan sampai periode inkubasi 24 jam walaupun dengan konsentrasi  $0,35 \times 10^6$  spermatozoa/ml.

Tabel 1. Tingkat kematangan inti oosit kambing setelah dikultur secara *in vitro* (IVM) pada periode waktu yang berbeda.

Periode	$\Sigma$ oosit	Tingkat kematangan inti (%)				Membelah (%)
		GV	GVBD	MI	M II	
18 jam	82	8 (9,76)	19 (23,17)	25 (30,49)	30 (36,59) <sup>a</sup>	-
22 jam	92	-	4 (4,35)	16 (17,39)	72 (78,26) <sup>b</sup>	-
26 jam	75	-	1 (1,33)	8 (10,67)	66 (88,00) <sup>b</sup>	-
30 jam	77	-	-	11 (14,29)	64 (83,12) <sup>b</sup>	2 (2,60)

Pada kolom yang sama perbedaan huruf menunjukkan perbedaan yang nyata (a-b,  $P < 0,05$ )



□ Ejakulat-199 ■ Ejakulat-BO □ Beku-cair-199 □ Beku-car-BO

Gambar 2. Konsentrasi spermatozoa dengan motilitas progresif ( $\times 10^6$ ) pada media fertilisasi dan periode inkubasi yang berbeda.

Pada spermatozoa beku-cair, konsentrasi spermatozoa dengan motilitas progresif pada 0 jam sudah cukup rendah ( $1,70 \times 10^6$  spermatozoa/ml pada medium TCM-199 dan  $1,85 \times 10^6$  spermatozoa/ml pada medium BO), dan menurun nyata setelah 3 jam inkubasi (tidak didapatkan motilitas progresif pada medium TCM-199 dan  $0,25 \times 10^6$  spermatozoa/ml pada medium BO). Setelah mencapai 24 jam inkubasi tidak didapatkan spermatozoa dengan motilitas progresif pada kedua medium fertilisasi. Kemampuan hidup spermatozoa serta konsentrasi spermatozoa motilitas progresif sangat menentukan tingkat fertilisasi *in vitro*. Periode inkubasi untuk fertilisasi *in vitro* pada kambing dilakukan selama 17 jam (De Smedt *et al.*, 1992; Crozet *et al.*, 1995) sampai 24 jam (Younis *et al.*, 1991; Mogas *et al.*, 1997).

Keberhasilan fertilisasi bisa dilihat dengan terbentuknya pronukleus jantan dan betina (diploid), 18 jam setelah inkubasi oosit dan spermatozoa. Keadaan abnormal yang ditemukan adalah hanya ditemukannya satu pronukleus (haploid). Hal ini kemungkinan adalah berasal dari pronukleus betina yang berkembang tanpa diikuti oleh pembentukan pronukleus jantan.

Keberhasilan perkembangan embrio kambing melalui teknik maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 1. Tingkat maturasi oosit kambing didapatkan 76,19% setelah inkubasi selama 24 jam. Namun demikian tingkat fertilisasi yang cukup rendah (40,91%) didapatkan setelah dilakukan fertilisasi *in vitro* menggunakan spermatozoa ejakulat.

Kegagalan fertilisasi dapat disebabkan oleh beberapa hal: 1) tingkat maturasi oosit (baik inti maupun sitoplasma) yang kurang sempurna (Moore dan Trounson, 1977), 2) kemampuan spermatozoa membuahi oosit (kapasitas dan reaksi akrosom) yang kurang memadai, 3) kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit

sehingga terjadi kegagalan pembentukan pronukleus jantan (Crozet dkk., 1995).

Tabel 1. Keberhasilan perkembangan embrio kambing melalui teknik maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*.

Tingkat perkembangan	Keberhasilan perkembangan
Jumlah oosit	452
Oosit matang (mencapai tahap MT II)*	32/42 (76,19%)
Oosit terbuahi**	18/44 (40,91%)
Embrio membelah (tahap 2 sampai 8 sel)	172/366 (47,00%)
Embrio mencapai tahap morula/blastosis	141/366 (38,52%)

\* Sampel yang digunakan sebanyak 42 oosit.

\*\* Sampel yang digunakan sebanyak 44 oosit.

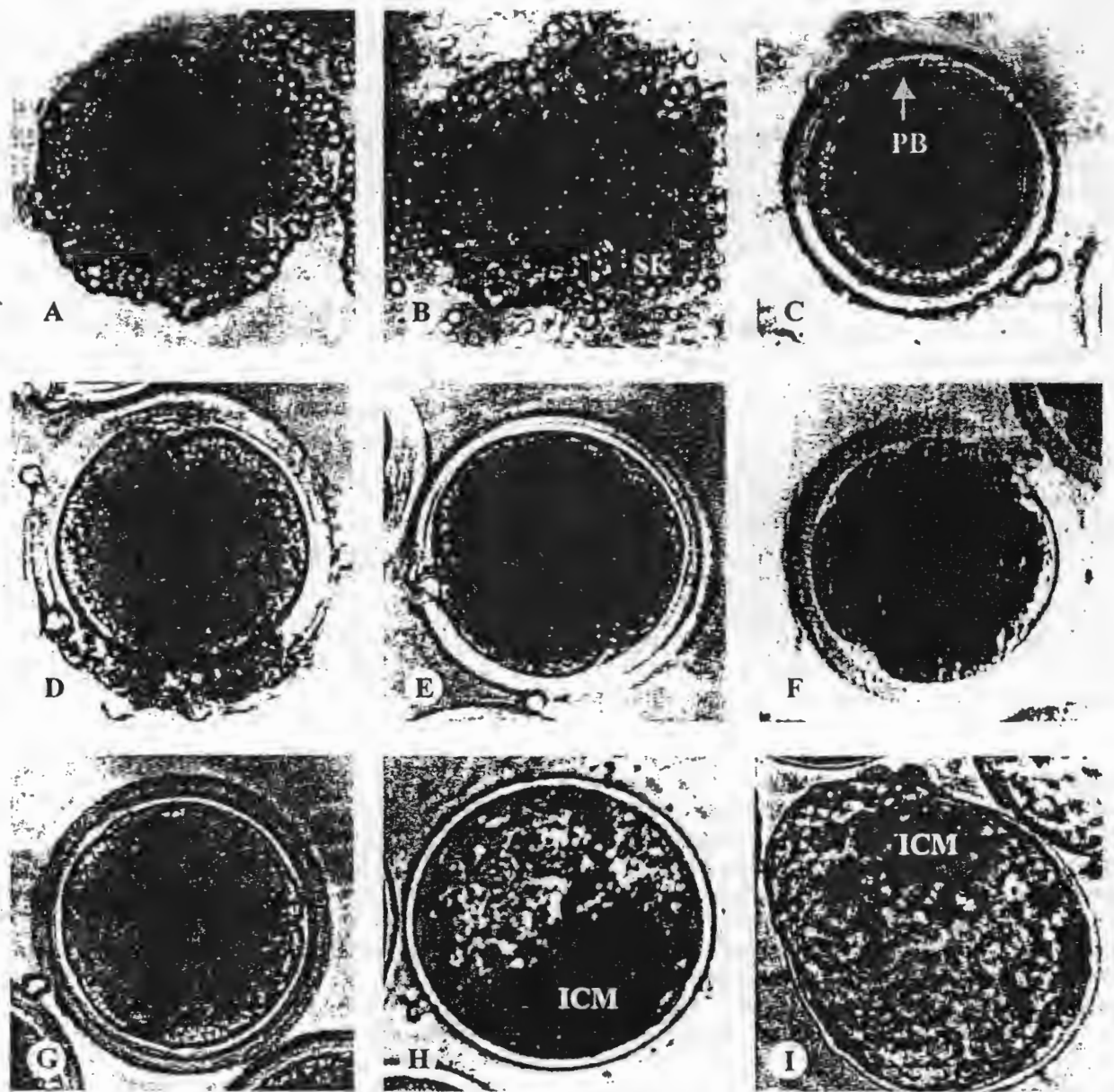
Pada penelitian ini 47,00% embrio mampu berkembang mencapai tahap 2 sampai 8 sel setelah 48 jam kultur secara *in vitro*, dan 38,52% mencapai tahap perkembangan morula/blastosis (Gambar 3). Namun demikian embrio mengalami hambatan pada tahap perkembangan selanjutnya mencapai blastosis. Kejadian yang serupa juga dilaporkan oleh Keskinetepe dkk. (1994) dan Crozet dkk. (1995). Hambatan perkembangan tersebut diduga karena maternal mRNA spesifik yang berperan pada masa kritis dari periode kompaksi dan diferensiasi blastosis terakumulasi pada tahap akhir perkembangan folikel. Pada tahap tersebut oosit telah mengalami sintesa faktor maternal yang diperlukan untuk menunjang proses maturasi, fertilisasi, dan perkembangan embrio tahap awal.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa oosit kambing yang dikoleksi dari ovarium berasal dari rumah potong hewan mampu mengalami pematangan (maturasi) secara *in vitro*. Selanjutnya oosit dapat dibuahi menggunakan spermatozoa ejakulat dan mampu berkembang pada kultur *in vitro* mencapai tahap morula/blastosis.

## Ucapan terima kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, kontrak nomor: 61/P21PT/DPPM/98/PHB/VII/1/V/1998, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Dirjen DIKTI DEPDIKBUD. Terima kasih kepada Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari, Malang atas bantuan spermatozoa beku kambing.



Gambar 3. Perkembangan oosit kambing pada proses produksi embrio secara *in vitro*. A. Oosit yang baru diaspirasi dari ovarium, pada kondisi belum matang (ditandai dengan sel kumulus kompak yang mengelilingi oosit), B. Oosit matang setelah diinkubasi secara *in vitro* selama 24 jam, sel kumulus longgar, C. Fertilisasi *in vitro* selama 18 jam, dan perkembangan embrio mencapai: D. 2 sel, E. 4 sel, F. 8 sel, G. Tahap morula, H. Tahap blastosis, dan I. Embrio *hatched*. SK: sel kumulus; BK: benda kutub; ICM: inner cell mass.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baguisi A., E. Behboodi, D. T. Melicn, J. S. Pollock, M. M. Destrempe, *et al.* 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.*, 17:456-461.
- Boediono A., M. Takagi, S. Saha and T. Suzuki. 1994. The influence of day 0 and day 7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:261-264.
- Boediono A., S. Saha, C. Sumantri and T. Suzuki. 1995. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:1073-1079.
- Boediono A. and T. Suzuki. 1996. *In vitro* development of Holstein and Japanese Black breeds embryo. *Media Veteriner*, 3:3-15.
- Boediono A. dan T. Damayanti. 1996. Dari limbah rumah potong hewan bisa dihasilkan anak sapi. *Spektrum*, 10:32-33.
- Brackett B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Chemineau P., Y. Cagnie, Y. Guerin, P. Orgeur and J. C. Vallet. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goat. *FAO Animal Production and Health Paper*. Rome. 222 pp.
- Crozet N., M. Ahmed-Ali and M. P. Dubos. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 103:293-298.
- De Smedt V., N. Crozet, M. Ahmed-Ali, A. Martino and Y. Cagnie. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, 37:1049-1060.
- De Smedt V., N. Crozet and L. Gall. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.*, 269:128-139.
- Goto K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 83:753-758.
- Handyside A. H. and S. A. Hunter. 1984. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocyst *in situ* using polynucleotide-specific fluorochromes. *J. Exp. Zool.*, 231:429-434.
- Mogas T., M. J. Palomo, M. D. Izquierdo and M. T. Paramio. 1997. Development capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology*, 47:1189-1203.
- Pawshe C. H., A. Palanisamy, M. Taneja, S. K. Jain and S. M. Totey. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology*, 46:971-982.
- Pinyopummintr T. and B. D. Bavister. 1991. *In vitro*-matured / *in vitro*-fertilized bovine oocytes can developed into morula / blastocyst in chemically defined protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- Prokofiev M.I., L. K. Ernst, N. M. Suraeva, I. S. Lagutina, N. N. Udavlennikova, A. Z. Kesyan and A. I. Dolgohatskiy. 1992. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology*, 38:461-469.
- Suzuki T., Y. Sakai, T. Ishida and T. Kanouchi. 1991. Production of identical twins from bovine embryos split pre- or post-freezing. *Jpn. Anim. Reprod.*, 37:237-242.
- Younis A. I., K. A. Zuelke, K. M. Harper, M. A. L. Oliveira and B. G. Brackett. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.*, 44:1177-1182.