POTENSI OVARIUM DOMBA YANG DIPOTONG UNTUK PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO*

Jaswandi[1], M.A. Setiadi[2], A. Boediono[2], M.R. Toelihere[2] & Y. Sukra[2]
[1]*Fakultas Peternakan Universitas Andalas*
[2]*Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor*

ABSTRAK

Hewan yang dipotong atau mati masih dapat menghasilkan keturunan dengan memanfaatkan ovariumnya. Untuk mengetahui potensi ovarium hewan yang dipotong sebagai sumber oosit untuk produksi embrio *in vitro*, telah dilakukan penelitian dengan menggunakan ovarium domba yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH). Ovarium dibawa ke laboratorium dalam larutan fisiologis (NaCl 0.9 %) pada suhu 30-35° C. Oosit dikoleksi dengan cara penyayatan (*slicing*) kemudian jumlah dan kualitas oosit diamati dibawah mikroskop. Oosit kualitas A dan B (mempunyai sel-sel kumulus utuh dan sitoplasma yang homogen) dimatangkan dengan 2 sistem inkubasi yang berbeda yaitu dalam inkubator CO_2 5 % dan dalam inkubator konvensional (tanpa pengaturan kadar CO_2) selama 24 jam pada temperatur 38.5 °C. Pada inkubasi dengan CO_2 5%, oosit di kultur dalam medium TCM-199, sedang inkubasi dalam inkubator konvensional menggunakan TCM-199 yang disuplementasi dengan 20 mM Hepes. Rata-rata jumlah oosit yang diperoleh setiap ovarium adalah 9.69 oosit, dan kualitas A dan B adalah 3.19dan 2.031 oosit. Angka pematangan *in vitro* untuk sistem inkubasi dengan inkubator CO_2 5 % adalah 72.75 dan konvensional 68.36 % ($P > 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari setiap ovarium hewan yang dipotong dapat diperoleh 5.22 oosit yang layak digunakan untuk produksi embrio *in vitro*, dimana tahap pematangan oosit *in vitro* dapat dilakukan pada kondisi inkubasi dalam inkubator CO_2 5 % maupun inkubator konvensional.

Kata kunci : oosit domba, pematangan *in vitro* dan inkubator konvensional

PENDAHULUAN

Produksi embrio secara *in vitro* telah dilakukan pada berbagai spesies ternak seperti sapi (Trounson, *et al* 1994), kerbau (Totey, *et al*,1993), domba (Szolozi, *et al*. 1988, Brown, *et al*., 1998) kambing (Pawshe, *et al*, 1994) dan pada hewan liar seperti kucing, anjing dan cheetah (Beveridge & Jabtour, 1998). Produksi embrio *in vitro* dapat menggunakan oosit berasal dari ovarium hewan yang dipotong atau mati dan dari ovarium hewan yang masih hidup yang diperoleh melalui teknik *Ovum Pick-Up (OPU)* dengan bantuan ultrasounografi. Ovarium hewan yang dipotong merupakan sumber oosit yang murah dan mampu menyediakan oosit dalam jumlah banyak, sehingga dapat menjadi alternatif untuk produksi embrio dalam pelaksanaan Transfer Embrio (TE) dan mendukung pengembangan teknologi rekayasa embrio lainnya seperti khimera, partenogenesis dan kloning.

Kuantitas dan kualitas oosit yang diperoleh dari suatu ovarium dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain bangsa ternak (Champion & Robards, 2000, dan Lonergan, 1990), status nutrisi (Garcia-Bojolil, 1991), status ovarium (Hendri, 1998) dan teknik koleksi oosit (Pawshe, 1994). Dalam pemanfaatan ovarium ternak yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) untuk produksi embrio in vitro belum semua potensi yang ada dapat digunakan karena keterbatasan daya hidup dan teknologi koleksi ovarium. Beberapa peneliti mencoba mengatasi kendala tersebut dengan mengganti peranan dan sumber CO_2 5% yang digunakan selama pematangan oosit (Suzuki, *et al*. 1999, Khan, *et al*.1996, DeSmedt, *et al*., 1992, Martino, *et al*., 1995 dan Legal, 1996)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi oosit dari ovarium ternak domba yang diperoleh dari RPH untuk produksi embrio in vitro, dan untuk mengetahui efektifitas sistem inkubasi tanpa CO_2 5% yang memungkinkan proses pematangan oosit diluar laboratorium atau selama transportasi.

MATERI DAN METODE

Koleksi Oosit

Ovarium domba yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) dibawa ke laboratorium dalam medium fisiologis (0,9% NaCl, 100 IU penisilin/ml dan 10 mg streptomisin/ml) yang disimpan dalam termos pada temperatur 30-35° C. Koleksi oosit dilakukan dengan teknik *slicing* dalam petridis yang berisi media PBS (Nissui, Japan) yang disuplementasi 3% Calf Serum, 50 µg gentamisin/ml. Oosit dibagi atas 4 kategori kualitas yaitu A, B, C dan D (Loos, *et al*. 1989).

Pematangan Oosit

Proses pematangan dilakukan dengan menempatkan 15-20 oosit dalam mikrodrop (100 µg ul).

Medium pematangan yang digunakan terdiri dua macam medium yaitu *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199, M-5015, Sigma) yang mengandung 0 mM dan 20 mM Hepes. Kedua medium mendapat tambahan 10% Calf Serum, 10 µg/ml *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dan 50 µg gentamisin/ ml.

Mikrodrop ditutup dengan minyak mineral (Sigma, M-8410) lalu diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator CO_2 5%. Selanjutnya 15-20 oosit dimasukkan ke dalam setiap drop. Petridis yang berisi mikrodrop dari medium kontrol diinkubasi dalam inkubator CO_2 5%, sedangkan petridis dengan mikrodrop dari medium yang mengandung 20 mM Hepes diinkubasi dalam inkubator tanpa CO_2 5% (inkubator konvensional). Inkubasi pada kedua inkubator dilakukan selama 24 jam pada temperatur 39^{o}C.

Angka pematangan ditentukan dengan pewarnaan orcein. Oosit dibersihkan dari sel-sel kumulus, lalu difiksasi dalam larutan alkohol absolut: asetat glacial (3:1) selama 48 jam. Oosit selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan orcein 1% selama 10 menit dan status inti oosit ditentukan dengan mengamati di bawah microskop dengan pembesaran 40x10. Oosit matang ditandai oleh terlihatnya Polar Bodi I dan metafase Plate (MII). Data potensi ovarium dianalisis dengan *t-test* dan angka pematangan menggunakan Chi-kuadrat (Steel & Torrie, 1984)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Potensi Ovarium Sebagai Sumber Oosit

Variasi respon superovulasi dan kesulitan dalam koleksi oosit dari hewan hidup telah mendorong pemanfaatan oosit yang berasal dari ovarium hewan yang dipotong. Ukuran folikel yang diambil untuk produksi embrio in vitro umumnya 2 sampai 6 mm. Potensi ovarium dilihat dari ukuran folikel dan kualitas oosit yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah dan kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium domba

Status ovarium	Jumlah folikel			Kualitas oosit				Rata-rata oosit/ova
	<2mm	2- 6 mm	dominan	A	B	C	D	
Corpus Luteum	3,5 ± 3,26[a]	6,5 ± 2,98[a]	0	3,30 ± 1,07[a]	2,57 ± 1,50[a]	3,00 ± 1,49[a]	1,80 ± 1,39[a]	10,68 ± 2,98[a]
Folikel	4,43 ±3,95[a]	5,29 ±2,24[a]	0,14	3,08 ±3,28[a]	1,5 ± 2,57[a]	2,7 ± 1,29[a]	1,43 ± 1,46[a]	8,71 ± 1,26[a]
Rata-rata	3,965	5,895	0,07	3,19	2,03	2,85	1,62	9,69

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

Jumlah folikel dan kualitas oosit yang diperoleh dari kedua status ovarium secara statistik tidak berbeda nyata (P>0,05). Namun terdapat kecenderungan jumlah folikel berukuran 2-6 mm (5,89) lebih banyak dibandingkan dari folikel berukuran kecil dari 2 mm (3,96) dan folikel dominan (0,07). Hal yang sama juga dilaporkan pada ternak kambing (Rusiyantono, 2001). Pada Tabel 1 juga terlihat bahwa jumlah folikel berukuran 2-6 mm dari ovarium yang mempunyai korpus luteum cenderung lebih banyak dibandingkan dengan ovarium tanpa korpus luteum. Keberadaan korpus luteum akan memberikan korelasi positif terhadap jumlah folikel (Boediono, *et al.*, 1995). Perbedaan jumlah folikel diantara kedua status ovarium juga dapat disebabkan karena perkembangan folikel dominan erat hubungannya dengan regresi folikel sub ordinat, dan pertumbuhan folikel kecil baru mulai setelah folikel dominan selesai berkembang (Sirois & Fortune, 1988).

Dalam penelitian ini rata-rata jumlah oosit yang diperoleh dari setiap ovarium domba adalah 9,69 oosit, yang terdiri dari oosit berkualitas A 3,19, kualitas B 2,03, kualitas C 2,85 dan kualitas D 1,62 oosit. Sama halnya dengan jumlah folikel, potensi oosit (jumlah dan kualitas) dari ovarium domba yang mempunyai korpus luteum (fase luteal) sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan potensi oosit yang terdapat pada ovarium tanpa korpus luteum atau berada pada fase folikel (10,68 dan 8,71 oosit). Perbedaan tersebut diduga disebabkan karena perbedaan tingkat perkembangan folikel diantara kedua status ovarium.

Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa potensi ovarium sebagai sumber oosit yang layak digunakan untuk produksi embrio in vitro adalah 5,22 oosit. Pada ternak kambing dilaporkan perolehan oosit berkualitas baik dari setiap ovarium melalui teknik aspirasi adalah 7,8 oosit dan aspirasi 10,9 oosit. (Rusiyantono, 2001). Pada sapi rata-rata diperoleh 6,75 ± 5,22 oosit berkualitas A dari setiap ovarium (Hendri, 1998).

Jumlah oosit yang terkoleksi lebih banyak dibandingkan dari jumlah folikel berdiameter 2-6 mm. Hal ini disebabkan karena teknik *slicing* memungkinkan untuk terkoleksinya oosit dari bagian kortikal ovarium (Arlotto, *et al*, 1996). Pada teknik aspirasi oosit yang terkoleksi hanyalah oosit pada bagian vesikuler. Disamping jumlah oosit yang lebih banyak dan persentase oosit dengan sel-sel kumulus utuh juga lebih tinggi dibandingkan dengan metode aspirasi (Pawshe, *et al.* 1994). Kelemahan teknik slicing adalah membutuhkan jumlah media yang lebih banyak (Ondho, 1998) dan waktu yang lebih lama (Pawshe, *et al.*, 1994).

Pematangan Oosit In Vitro

Proses pematangan oosit merupakan salah satu tahap penting dalam produksi embrio in vitro. Angka pematangan oosit domba yang dilakukan menggunakan inkubator CO_2 5% dan tanpa CO_2 5% (inkubator konvensional) dapat dilihat pada table 2 berikut.

TabeL 2. Angka pematangan oosit menurut perlakuan sistem inkubasi (%)

Perlakuan Inkubator	Jumlah oosit	Tahap Pematangan Inti (%)					
		GV	GVBD	MI	AI	TI	MII
Inkubator CO2 5%	69	3 (4,34)	7 (10,14)	9 (13,04)	-	-	50 (72,75)[a]
Inkubator konvensional	74	1 (1,35)	8 (11,59)	10 (13,51)	-	4 (5,41)	51 (68,36)[a]

Angka pematangan oosit untuk inkubator CO_2 5% dan konvensional masing-masing adalah 72,75 dan 68,36% ($P>0,05$). Hasil yang diperoleh dari kedua metode pematangan oosit hampir sama dengan yang dilaporkan oleh beberapa peneliti lainnya (Guler, *et al*, 2000). Oosit yang tidak matang selain disebabkan karena degenerasi, diduga juga disebakan terkoleksinya oosit dari folikel kurang dari 2 mm. Sebagian besar dari oosit yang berasal dari folikel yang berukuran kurang dari 2 mm akan terhenti pada Metafase I (MI) (De Smedt, *et al.*, 1992)

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pematangan oosit secara in vitro dapat dilakukan dalam inkubator konvensional. Keberhasilan pematangan oosit tanpa CO_2 5% juga telah dilaporkan pada ternak sapi dan bison (Westhusin, *et al.*, 1992), dan ternak kambing (DeSmedt, *et al*, 1992, Martino, *et al*, 1995 dan Le Gal, 1996).

Menurut Shamsuddin, *et al.*, (1998), tidak terdapat perbedaan tingkat pematangan oosit yang dikultur dengan CO_2 5% dan tanpa CO_2 5%. Pengamatan terhadap sel-sel kumulus menunjukkan ekspansi sel-sel tersebut dimulai 12 jam setelah kultur saat inti berada pada tahap Metafase I (M I).

Peneliti lain melaporkan bahwa oosit domba yang dikultur menggunakan medium bikarbonat-199 dalam eppendorf (tube tertutup) dan petridish, lalu diinkubasi dalam inkubator konvensional selama 24 jam menghasilkan angka pematangan 39% dan 29% (Margawati, *dkk*, 1997). Hasil penelitian ini menunjukkan penambahan Hepes ke dalam medium pematangan dapat mempertahankan pH medium yang optimal untuk pematangan oosit sehingga dapat meningkat angka pematangan oosit yang diinkubasi dalam inkubator konvensional. Menurut Fresney (1987) Hepes merupakan buffer yang efektif untuk mempertahankan pH medium kultur pada kisaran fisiologis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari setiap ovarium ternak domba yang dipotong dapat diperoleh 5,22 oosit yang layak digunakan untuk produksi embrio *in vitro*, dimana pematangan oosit *in vitro* dapat dilakukan pada kondisi inkubasi dalam inkubator CO_2 5% maupun inkubator konvensional.

DAFTAR PUSTAKA.

Arlotto, T., J.L. Schwartz, N.L.First & Leifried-Rutledge. 1996. Aspect of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 45: 943-956.

Beveridge, D.R. & H. N. Jabtour. 1998. Potential of assisted technique for the conservation of endangerous species in captive. *Veterinary Record.* 143 : 159-168

Boediono, A., A. Rajamahendran, S. Saha, C. Soemantri & T. Suzuki. 1995. Effect of presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production. *Theriogenology,* 43 : 169 (abst)

Brown, B.W. & T. Radziowic. 1998. Production of sheep embryos in vitro fertilization and development of progeny following single and twin embryos transfer. *Theriogenology.* 49: 1525-1537.

Champion, S.C. & G.E. Robards. 2000. *Follicle characteristics,* seasonal changes In fibre cross-sectional area & ellipticity in Australian specialty carpet wool sheep, Romneys amd Meribos. *Small Ruminants Research.* 38 : 71-82.

De Smedt, Crozet, N., M. Ahmed-ali, A. Martino & Y. Cognie. 1992. In vitro maturation and fertilization goat oocytes. *Theriogenology.* 37 : 1049-1066

Fresnhney, I.R. 1987. *Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique.* Alan R. Liss, Inc. New York.

Garcia-Bojolil, C.M., C.R.Staples, J.D. Savio, M.Drost & W.W. *Tatcher.* 1991. Effect of dietary protein on follicle growth & embryoa development of superovulated non lactating Holstein cow. *Jounal of Dairy Sci.* 74:195

Guler, A., N. Poulin, P. Mermillod, M. Terqui & Y. Cognie. 2000. Effect of Growth Factors, EGF, and IGF-I, and Estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology.* 54: 209-218.

Hendri. 1999. Penambahan berbagai jenis serum pada medium TCM-199 untuk produksi embrio sapi melalui teknik Fertilisasi in Vitro. *Jurnal Peternakan dan Lingkungan.* 5: 1-8

Khan, N.A., Y. Kikkawa, C. Soemantri, S. Saha, M.S. Murakami, A. Boediono & T. Suzuki. 1996. Effect of gas atmosphere on development of bovine embryos using a simple portable inkubator. *Japan Embryo Transfer Soc.* 113-123

Le Gal, F. 1996. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 45:1147-1185

Loos, F., C. Van Vliet, P. Van Maurik, T.A.M. Kruip. 1989. Mhorphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 24: 197-204

Margawati, E.T., I. Supriatna, T.L. Yusuf, Y. Supriondho & T. Hastuti. 1997. Maturasi oosit domba secara ion vitro tanpa CO_2. *Kongres I dan Seminar Ilmiah, Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia.* Surabaya, 12-14 . Maret 1997.

Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo & M.T. Paramio. 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goats oocytes. *Theriogenology.* 43: 473-485

Ondho, Y.S. 1998. Pengaruh Penambahan FSH, Estradiol-17β dan Kultur Sel Tuba Fallopii ke Dalam TCM-199 Untuk Meningkatkan Pematangan Oosit dan Perkembangan Embrio Domba Dalam Program Fertilisasi In Vitro. *Disertasi.* Pascasarjana IPB. Bogor.

Pawshe, C.H., S.M. Totey & S.K. Jain. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology.* 42:117- 125

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

Totey, S.M., C.H. Pawshe & G.P. Singh. 1993. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes: effect of media hormon and sera. *Theriogenology.* 39: 1153-1171

Trounson, A., D. Pushett, L.J. Maclellan, I. Lewis & Gardner. 1994. Current status of IVM/IVF and embryos culture in humas and farm animals. *Theriogenology.* 39: 1153-1171

Shamsuddin, M., B. Larson & H. Rodriquez-Martinez. 1998. Maturation in related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci,*31: 49-60.

Siroi, J. & J.F. Fortune. 1988. Ovarian follicle dynamic during the estur cycle in heifer monitored by real time ultrasounografi. *Biol. Reprod.* 39 : 308-317

Suzuki, T., C. Sumantri, N.H.A. Khan, M. Murakami & S. Saha. 1999. Development of a simple, portable carbon dioxide inkubator for in vitro of bovine IVF embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 54 : 149-157

Szolozi, D., V. De Smet, N. Crozet & C. Brender. 1988. In vitro maturation of sheep ovarium oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.* 28: 1047-1080.

Rusiyantono, Y. 2001. Produksi embrio kambing (*Capra sp*) in virtro dan upaya kriopreservasi dengan menggunakan metode vitrifikasi. *Disertasi Pascasarjana IPB.* Bogor.

Westhusin, M.E., Moreno, J.F, R.M. DeAzambuja & D.C. Kraemer. 1992. Transport and maturation of bovine oocytes in a non-CO_2 environment. *Bio. Reprod.* 1 :48. (suppl).