PRODUKSI EMBRIO KAMBING DENGAN TEKNOLOGI MATURASI, FERTILISASI DAN KULTUR *IN VITRO*

A. Boediono, Y. Rusiyantono, K. Mohamad, I. Djuwita, dan Y. Sukra

Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB
Jalan Taman Kencana 3, Bogor 16151

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan meneliti perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* dalam upaya produksi embrio kambing. Ooosit dikoleksi melalui aspirasi ovarium yang memiliki atau tidak memiliki Corpus Luteum (CL). Keberadaan CL diamati dan dilihat pengaruhnya terhadap jumlah folikel yang diaspirasi (diameter 2-5 mm), jumlah folikel dominan (diameter >5mm), berat serta ukuran ovarium. Maturasi oosit hasil aspirasi dilakukan di dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 yang disuplementasi dengan 10% serum kambing, 0,01 mg/ml *follicle stimulating hormone* (FSH) dan 50 µg/ml gentamicin sulfat. Oosit dimaturasi di dalam inkubator 5% CO_2 pada suhu 38,5°C selama 18, 22, 26, atau 30 jam. Penelitian selanjutnya, oosit hasil maturasi diinseminasi dengan spermatozoa ejakulat (konsentrasi akhir $5x10^6$ spermatozoa/ml) yang telah mengalami kapasitasi *in vitro*. Delapan belas jam setelah inseminasi, sigot dikultur dalam media TCM-199 yang disuplementasi 10% serum kambing, 5 µg/ml insulin dan 50 µg/ml gentamicin sulfat, selanjutnya diamati perkembangannya mencapai tahap pembelahan. Keberadaan CL berkorelasi positif terhadap jumlah folikel berdiameter 2-5 mm sebagai sumber oosit. Jumlah folikel dengan diameter 2-5 mm lebih tinggi pada ovarium dengan CL (10,23 folikel per ovarium) dibandingkan dengan ovarium tanpa CL (7,92 folikel per ovarium). Jumlah folikel dominan pada ovarium dengan CL (0,23 folikel per ovarium) lebih rendah dibandingkan dengan ovarium tanpa CL (0,64 folikel per ovarium). Keberadaan CL pada ovarium juga berkorelasi positif dengan berat dan ukuran ovarium. Tingkat maturasi oosit yang mencapai tahap metafase II adalah 25,64%; 78,26%; 80,56%; dan 73,68% berturut-turut untuk periode maturasi 18, 22, 26, dan 30 jam. Data menunjukkan periode maturasi terbaik adalah 22 sampai 26 jam. Kejadian partenogenesis spontan (2,63%) terlihat pada 30 jam maturasi *in vitro* sebagai akibat *over maturation*. Perkembangan oosit hasil maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* menunjukkan tingkat pembelahan yang tidak berbeda nyata untuk kedua macam sumber oosit (20,00% dan 12,23% berturut-turut untuk oosit yang berasal dari ovarium dengan dan tanpa CL). Hasil ini menunjukkan bahwa embrio kambing dapat dihasilkan melalui maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* dari oosit yang diperoleh dari ovarium dengan atau tanpa CL.

Kata kunci: Oosit kambing, maturasi, fertilisasi, kultur, *in vitro*

PENDAHULUAN

Salah satu dari banyak faktor pembatas yang esensiil pada transfer embrio pada ruminansia kecil adalah biaya yang mahal karena masih diperlukan perasat 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 atau klonning dan tranfer gen.

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).

Sampai saat ini informasi keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* pada kambing masih belum banyak, sehingga untuk kondisi Indonesia yang mempunyai populasi kambing yang cukup banyak masih perlu adanya penelitian yang menyeluruh.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meneliti perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Metode fertilisasi *in vitro* yang digunakan untuk produksi embrio sesuai dengan metode yang telah dilakukan sebelumnya oleh BOEDIONO *et al.* (1994) dengan sedikit modifikasi.

Koleksi dan maturasi oosit

Ovari kambing diambil dari rumah potong hewan dalam medium NaCl fisiologis pada suhu 30°C dan dibedakan berdasarkan keberadaan korpus luteum (CL) pada ovarium: ovarium dengan CL dan ovarium tanpa CL. Sebelum dilakukan koleksi oosit dilakukan pengamatan terhadap morfologi ovarium meliputi jumlah folikel berukuran diameter 2-5 mm (folikel yang layak untuk fertilisasi *in vitro*) dan diameter >5 mm (folikel dominan), ukuran panjang dan lebar serta berat ovaium. Koleksi oosit dilakukan dengan cara: a) aspirasi oosit dari folikel, follikel berukuran diameter antara 2-5 mm diambil dengan cara aspirasi menggunakan jarum berukuran 20G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang sebelumnya telah diisi 0,5 ml larutan modifikasi phosphate buffered saline (mPBS), dan b) mencacah ovarium, dengan menggunakan pisau silet yang telah disterilisasi dilakukan 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) ditambahkan dengan serum kambing 10%, folicle stimulating hormone (FSH) 0,01 mg/ml dan gentamicin sulfat 50 µg/ml. Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan dalam inkubator CO_2 5% dengan suhu 38,5°C dengan periode inkubasi yang berbeda (18, 22, 26, dan 30 jam).

Koleksi dan persiapan spermatozoa

Spermatozoa segar didapat dari pejantan dengan menggunakan vagina buatan. Pencucian spermatozoa dilakukan dengan sentrifugasi sebanyak 2 kali masing-masing dengan kecepatan 500G selama 5 menit dalam larutan BRACKETT dan OLIPHANT (BO; BRACKETT dan OLIPHANT, 1975) yang telah ditambahkan kafein 2,5 mM (Kaf-BO). Spermatozoa hasil pencucian diencerkan dengan media yang telah ditambahkan BSA 0,3% dan heparin 20 µg/ml sehingga konsentrasinya menjadi 5 x 10^6 spermatozoa/ml.

Fertilisasi *in vitro*

Oosit yang telah matang, dicuci dalam medium fertilisasi (Kaf-BO) 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_2 5% dengan suhu 38,5°C.

Perkembangan embrio *in vitro*

Sigot hasil fertilisasi *in vitro* dicuci dari medium inseminasi untuk selanjutnya dilakukan kultur dalam medium kultur (TCM-199) dengan penambahan insulin 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 kedua untuk menghitung tingkat perkembangan sampai tahap pembelahan.

Perwarnaan pronukleus

Pengamatan pronukleus dilakukan dengan metode pewarnaan Aceto-Orcein seperti yang pernah dilakukan oleh BOEDIONO *et al.*, (1995b). Oosit yang akan dievaluasi diambil dari medium maturasi sesuai dengan periode maturasi (18, 22, 26, dan 30 jam). 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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui gambaran makroskopis ovarium kambing telah dilakukan pengamatan terhadap 184 ovarium yang terdiri dari 100 ovarium dengan corpus luteum (CL) dan 84 ovarium tanpa CL (Tabel 1). Dari hasil pengamatan didapatkan bahwa jumlah folikel berukuran 2-5 mm (merupakan folikel yang layak untuk fertilisasi *in vitro*) lebih banyak didapatkan pada ovarium dengan CL (rata-rata 10,12 folikel per ovarium) daripada ovarium tanpa CL (rata-rata 7,92 folikel per ovarium). Namun demikian jumlah dominan folikel (folikel dengan diameter lebih dari 5 mm) terdapat lebih banyak pada ovarium tanpa CL (rata-rata 0,64 dominan folikel per ovarium) daripada ovarium dengan CL (rata-rata 0,23 dominan folikel per ovarium). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh BOEDIONO *et al.* (1995a), keberadaan CL akan memberikan korelasi positif terhadap jumlah folikel.

Tabel 1. Gambaran makroskopis ovarium kambing

Ovarium	Jumlah	Jumlah folikel per ovarium		Berat per ovarium	Ukuran ovarium (cm)	
	ovarium	2-5 mm	>5 mm	(gr)	Panjang	Lebar
Dengan CL	100	10,12 [a]	0,23 [a]	1,67 [a]	1,964	1,388
Tanpa CL	84	7,92 [b]	0,64 [b]	0,98 [b]	1,607	1,114

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata P>0,05)

Pada ovarium dengan CL didapatkan jumlah folikel yang lebih banyak dan mempunyai kualitas oosit yang lebih baik dibandingkan dengan ovarium tanpa CL, walaupun pada individu yang sama (PIERSON dan GINTHER, 1987). Keberadaan CL yang menghasilkan progesteron dalam sirkulasi tubuh akan menyebabkan penghambatan pertumbuhan dominan folikel mencapai ovulasi sehingga mengurangi pengaruh dominan folikel terhadap pertumbuhan dan perkembangan folikel-

folikel lainnya yang lebih kecil. Hal ini mengakibatkan jumlah folikel-folikel berikutnya akan lebih banyak dengan kualitas yang lebih baik (TAYLOR dan RAJAMAHENDRAN, 1991; SAVIO *et al.*, 1993). Dari hasil pengamatan terlihat bahwa pada ovarium kambing bisa didapatkan dominan folikel atau jumlah CL antara 1 sampai 4. Keberadaan dominan folikel atau CL yang lebih dari satu sesuai dengan kemampuan kambing untuk ovulasi normal lebih dari satu dan dapat menghasilkan anak antara 1 sampai 4 (RUMICH, 1967).

Ukuran panjang dan lebar ovarium mempunyai korelasi positif dengan berat ovarium. Berat rata-rata ovarium dengan CL (1,67 gr) lebih berat dibandingkan dengan ovarium tanpa CL (0,98 gr). CL terbentuk segera setelah ovulasi sebagai akibat hipertrofi dan luteinisasi sel-sel granulosa (HAFEZ, 1993). CL akan bertambah berat secara cepat sampai sekitar pertengahan periode siklus berahi. Pada kambing, CL akan terus bertambah berat mulai hari ke-2 sampai ke-8 dan akan bertahan sampai hari ke-15 dimana proses regresi mulai terjadi (ERB *et al.*, 1971).

Koleksi oosit kambing pada ovarium dengan CL menggunakan cara aspirasi rata-rata didapatkan sebanyak 10,12 oosit per ovarium. Jumlah tersebut lebih sedikit dibandingkan bila dilakukan dengan metode yang sama pada sapi (13,25 oosit per ovarium) seperti dilaporkan oleh BOEDIONO dan SUZUKI (1996). Usaha mengoptimumkan jumlah dapatan oosit dapat dilakukan dengan mencacah ovarium setelah aspirasi. Dengan metode tersebut didapatkan tambahan rata-rata sebanyak 8,19 oosit per ovarium.

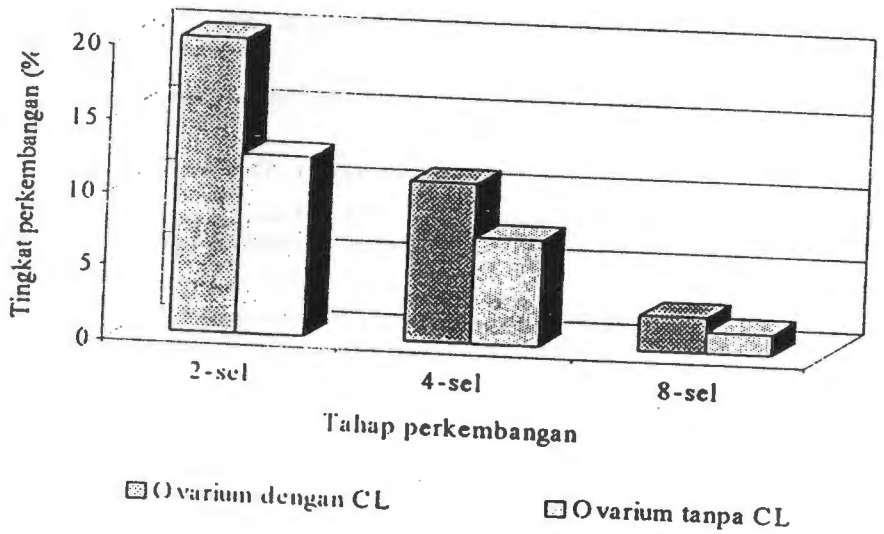
Untuk keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro* diperlukan informasi mengenai waktu dan tingkat maturasi oosit hasil aspirasi yang mencapai tahap metafase II (M II) setelah dikultur secara *in vitro*. Telah diketahui, fertilisasi hanya bisa terjadi pada oosit yang telah mencapai tahap M II. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa pada periode kultur 18 jam didapatkan oosit yang masih berada pada tahap *germinal vesicle* (GV, 15,38%) ataupun *germinal vesicle break down* (GVBD, 25,64%). Tingkat maturasi yang tinggi (M II) didapatkan setelah dilakukan kultur *in vitro* selama 22 (78,26%), 26 (80,56%) dan 30 jam (73,68%) (Tabel 2). 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; CROZET *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 yang bersifat haploid (2,63%) yang terjadi pada 30 jam inkubasi. Seperti dilaporkan pada sapi oleh BOEDIONO *et al.* (1995b), periode maturasi oosit yang terlalu panjang (*over maturation*) akan menyebabkan kejadian partenogenesis secara spontan.

Tabel 2 Tingkat maturasi oosit kambing setelah dikultur secara *in vitro* pada periode waktu yang berbeda.

Periode IVM	Σ oosit	Tingkat maturasi (%)				Cleavage	TI
		GV	GVBD	M I	M II		
18 jam	39	6(15,38)	10(25,64)	13(33,33)	10(25,64)	-	-
22 jam	46	-	-	9(19,57)	36(78,26)	-	1(2,17)
26 jam	36	-	-	3(8,33)	29(80,56)	-	4(11,11)
30 jam	38	-	-	7(18,42)	28(73,68)	1(2,63)	2(5,26)

Keterangan : IVM: *in vitro maturation*; GV: *germinal vesicle*; GVBD: *germinal vesicle break down*; M I: Metafase I; M II: Metafase II, TI: tidak teridentifikasi.

Keberhasilan perkembangan embrio kambing melalui teknik maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* dapat dilihat pada gambar 1. Tingkat perkembangan embrio mencapai 2-sel yang berasal dari oosit hasil aspirasi dari ovarium dengan CL cenderung lebih tinggi (20,00%, 75/375) daripada yang berasal dari ovarium tanpa CL (12,23%, 17/139). Perkembangan embrio kambing tahap 2, 4 dan 8 sel didapatkan pada 48 jam setelah fertilisasi. Pada perkembangan embrio sapi telah dilaporkan bahwa kualitas dan viabilitas oosit yang dikoleksi dari ovarium dengan CL untuk berkembang sampai tahap preimplantasi lebih baik jika dibandingkan dengan oosit yang berasal dari ovarium tanpa CL (BOEDIONO *et al.*, 1995a).



Gambar 1. Tingkat perkembangan embrio kambing hasil fertilisasi *in vitro* oosit yang diperoleh dari ovarium dengan dan tanpa CL

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa jumlah folikel yang diaspirasi (berukuran 2-5 mm diameter) lebih banyak pada ovarium dengan CL daripada ovarium tanpa CL, sebaliknya jumlah folikel dominan (berukuran lebih dari 5 mm diameter) terdapat lebih banyak pada ovarium tanpa CL daripada ovarium dengan CL. Dalam upaya produksi embrio kambing dengan teknologi *in vitro* didapatkan tingkat maturasi (mencapai tahap metafase II) yang tinggi pada oosit setelah inkubasi *in vitro* pada medium maturasi selama 22 sampai 26 jam. Partenogenetik spontan terjadi pada oosit yang mengalami maturasi dalam waktu yang berlebihan (*over maturation*) yaitu setelah di inkubasi *in vitro* selama 30 jam. Sedangkan tingkat perkembangan embrio sampai tahap pembelahan (2, 4 dan 8 sel) pada program produksi embrio secara *in vitro* tidak berbeda nyata untuk oosit yang diperoleh dari ovarium dengan ataupun tanpa CL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat dengan kontrak nomor: 61/P2IPT/DPPM/98/PHB/VII/1/V/1998, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat DirJen DIKTI DEPDIKBUD.

DAFTAR PUSTAKA

BOEDIONO A, TAKAGI M, SAHA S, and SUZUKI S. 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, RAJAMAHENDRAN A, SAHA S, SUMANTRI C, and SUZUKI T. 1995a. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production *in vitro* in cattle. *Theriogenology* 43:169 (Abst)

BOEDIONO A, SAHA S, SUMANTRI C, and SUZUKI T. 1995b. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:1073-1079.

BOEDIONO A and SUZUKI T. 1996. *In vitro* development of Holstein and Japanese Black breeds embryo. *Media Veteriner* 3:3-15.

BOEDIONO A dan DAMAYANTI T. 1996. Dari limbah rumah potong hewan bisa dihasilkan anak sapi. *Spektrum* 10:32-33.

BRACKETT BG and OLIPHANT G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.

CROZET N, AHMED-ALI M, and DUBOS MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size catagories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 103:293-298.

DE SMEDT V, CROZET N, AHMED-ALI M, MARTINO A, and COGNIE Y. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 37:1049-1060.

ERB RE, RANDEL RD, and CALLAHAN CJ. 1971. Female sex steroid changes during the reproductive cycle. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1,32:80.

GOTO K, KAJIHARA Y, KOSAKA S, KOBA M, NAKANISHI Y, and OGAWA K. 1988. Pregnancies after co-cukture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83:753-758.

HAFEZ ESE. 193. *Reproduction in Farm Animals*. Lea&Feberiger. Philadelphia. 573 pp.

MOGAS T, PALOMO MJ, IZQUIERDO MD, and PARAMIO MT. 1997. Development capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 47:1189-1203.

PAWSHE CH, PALANISAMY A, TANEJA M, JAIN SK, and TOTEY SM. 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.

PIERSON RA and GINTHER OJ. 1987. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 28:929-936.

RUMICH B. 1967. *The Goats of Indonesia. Regional Animal Production Officer*. FAO. Bangkok. pp:1-19.

SAVIO JD, THATCHER WW, MORRIS GR, ENTWISTLE K, DROST M, and MATTIACCI MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98:77-84.

TAYLOR C and RAJAMAHENDRAN R. 1991. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:115-123.

YOUNIS AI, ZUELKE KA, HARPER KM, OLIVEIRA MAL, and BRACKETT BG. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44:1177-1182.