

Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Silangan Simmental Peranakan Ongole dan Limousin Peranakan Ongole Secara *In Vitro*

(In Vitro Fertilization Rate of Bovine Simmental Ongole Crossbred and Limousin Ongole Crossbred Oocytes)

Hermilinda Parera

¹Program Studi Kesehatan Hewan, Politeknik Pertanian Negeri Kupang
Jalan Adisucipto Penfui Kupang
E-mail: *milindaparera81@gmail.com*.

ABSTRACT

Crossbreeding program by artificial insemination in Indonesian have use from Simmental and Limousin to local cows of Ongole Grade. Offspring from this crossbred called SimPO and LimPO which has advantages such as a large birth weight and rapid growth. The disadvantages of SimPO and LimPO cows are decreased of reproduction performance of Fenotipe 2 (F2) such as pregnancy rate being lower. Pregnancy stage will occur when oocyte had fertilized and had reached to embryos cleavage stage. The aims of this research was to determined in vitro fertilization rate of SimPO and LimPO oocyte. Ovaries from local abbotoir grouped into PO (control), SimPO and LimPO. Cumulus-oocyte complexes quality A and B were used for this research. Oocytes were fertilized using frozen semen of Simmental with concentration 5×10^6 cells / ml in Brackett oliphant (BO) medium. In vitro fertilization rate to observed polymorphonuclear (PMN) formation 10 hours after insemination using 1% aceto orcein staining to fertilized oocytes. Fertilized oocytes were washed were transferred into culture and incubated at 38,5 ° C, with 5% CO₂ and 95% humidity. These results indicate that in vitro fertilization rate of oocytes did not any significant differences between groups

Key words : in vitro fertilization rate, Crosbred, SimPO and LimPO.

PENDAHULUAN

Dalam rangka meningkatkan populasi ternak untuk mencukupi kebutuhan dalam negeri maka pemerintah melakukan program pengembangan peternakan seperti crosbreeding. Simmental Peranakan Ongole (SimPO) dan Limousin Peranakan Ongole (LimPO) merupakan salah satu hasil program *crossbreeding* ternak sapi di Indonesia. Keunggulan beternak sapi SimPO dan LimPO memiliki berat lahir yang besar, adaptasi yang baik dengan lingkungan dan pakan serat kasar serta memiliki penampilan yang eksotik. Fenomena yang terjadi

dilapangan berdasarkan pengamatan pada sapi SimPO dan LimPO dimana Fenotip 2 (F2) diduga mengalami penurunan performan reproduksi sehingga tingkat kebuntingan menjadi rendah. Keberhasilan kebuntingan dapat terjadi apabila oosit dapat terfertilisasi dan berhasil mencapai fase pembelahan embrio. Teknologi reproduksi bantuan atau *Assisted Reproduction Technology* (ART) seperti produksi embrio melalui proses (maturasi, fertilisasi dan pembelahan) secara *in vitro* merupakan teknologi yang dapat digunakan sebagai metode dalam memberikan informasi masalah infertilitas pada ternak (Karja *et al.*

2010). Fertilisasi *in vitro* menghasilkan embrio dengan berbagai tahap perkembangan dalam jumlah yang banyak. Secara genetik perkembangan embrio dipengaruhi oleh bangsa pejantan dan bangsa betina. Penelitian fertilisasi oosit secara *in vitro* pada sapi hasil *crossbreeding* seperti SimPO dan LimPO masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat fertilisasi pada oosit sapi Simmental Peranakan Ongole dan Limousin Peranakan Ongole secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Koleksi oosit. Oosit dari ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH), segera sesudah sapi disembelih dibersihkan jaringan yang menempel, dikelompokkan berdasarkan jenis sapi PO (kontrol), SimPO dan LimPO. Ovarium dicuci dengan NaCl 0,9% yang disuplementasi dengan penisilin 100.000 IU dan *streptomycin sulfat* 100 mg (Wonderindo, Indonesia). Ovarium ditempatkan dalam termos yang berisi larutan yang sama dengan suhu 35-37 °C dan dibawa ke laboratorium dalam waktu tidak lebih dari 2 jam setelah pemotongan. Oosit diaspirasi dari folikel yang berukuran 2-6 mm dengan menggunakan jarum 18 G yang dihubungkan dengan *Syringe disposable* 5 ml. Oosit yang dilapisi oleh sel-sel kumulus atau hanya dikelilingi lebih dari 2 lapis sel kumulus dengan ooplasma yang homogen yang digunakan untuk penelitian ini.

Maturasi *in vitro*

Oosit dimaturasi dalam media maturasi berupa *tissue culture medium-199* (Gibco Laboratoris, Grang Isldan,

NY) yang disuplementasi dengan *fetal bovine serum* 5%, FSH 0, 02 IU/ml (Sigma St. Louis, MO, USA), Taurine 0,05 gr (Sigma St. Louis, MO, USA) dan *gentamycin* 50 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). Oosit dimaturasi dengan cara memindahkan oosit dalam *polystyrene culture dish* (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) (35x10) pada drop-drop yang berisi media maturasi yang telah ditutupi dengan mineral oil (Sigma St. Louis, MO, USA). Satu drop maturasi berisi 100 µl media maturasi, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 %, kelembaban 95 %, pada suhu 38.5 °C selama 24 jam (Budiyanto *et al.* 2006).

Fertilisasi oosit *in vitro*

Oosit yang mengalami maturasi dicuci 2 kali dengan *Brackett oliphant* (BO) yang ditambah BSA 2 % (Sigma), Heparin 50 mg (Novo Industry A/S, Osaka, Jepang), Sodium Piruvat (Sigma) dan *gentamycin* (Sigma chemical Co.St. Louis MO, USA). Oosit yang telah dimaturasi dimasukkan ke dalam drop spermatozoa. Satu drop sperma berisi 100 µl. Selanjutnya 10-15 oosit dimasukkan dalam tetes yang berisi spermatozoa diatas dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 %, kelembaban 95 %, pada suhu 38,5 °C selama 10 jam.

Status fertilisasi

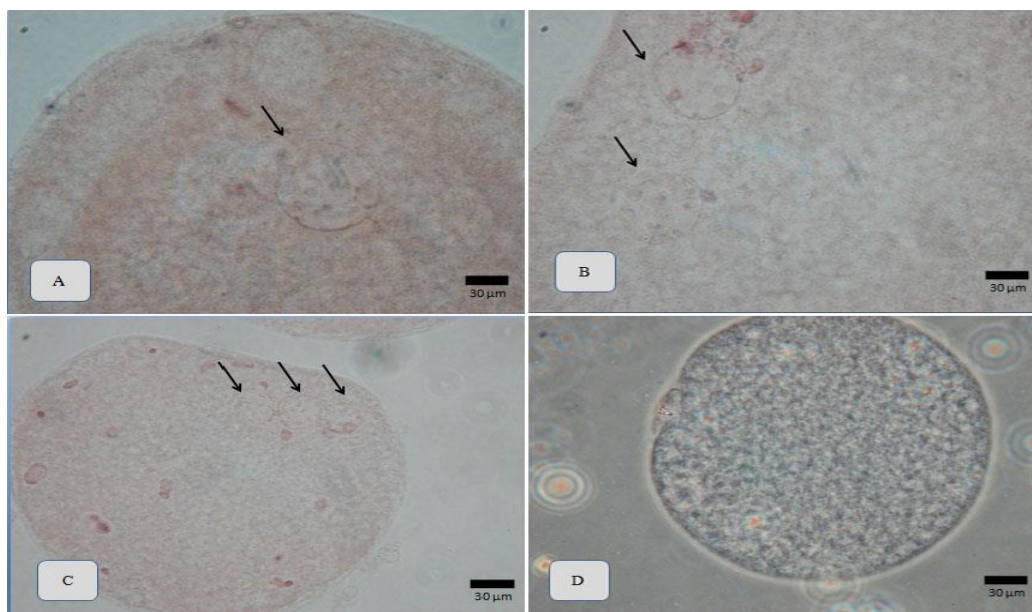
Status fertilisasi dievaluasi 10 jam setelah inseminasi. Pengamatan terhadap status fertilisasi dengan pengecatan *aceto orcein* 1 % (1 % orcein dan 45 % acetic acid) dan diperiksa dibawah mikroskop fase kontras. Status fertilisasi ditentukan dengan pembentukan Polimorfonuklear (PMN). Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap

(RAL), dengan lima kali ulangan. Persentase jumlah oosit yang mencapai fase-fase fertilisasi dan pembelahan embrio ditransformasi dalam bentuk *arc-sin*. Data yang sudah ditransformasikan kemudian dianalisis dengan *analysis of varian* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil Fisher menggunakan Statview program (Abacus concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Fertilisasi *In vitro*

Fertilisasi atau pembuahan secara *in vitro* melibatkan penetrasi ovum oleh spermatozoa, aktivitas ovum, pembentukan pronukleus jantan dan betina serta pertautan kromosom maternal paternal membentuk genom (Elder dan Dale 2011). Tingkat fertilisasi adalah jumlah oosit yang mempunyai 2 pronukleus (2PN) yaitu jantan dan betina.



Gambar 1. Status inti oosit setelah fertilisasi *in vitro*. Tanda panah menunjukkan status inti pada tahap: A. 1 Pronukleus (PN), B. 2PN, C. 3PN dan D. Fragmentasi.

Tabel 1. Arcsin tingkat fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO, SimPO dan LimPO*

Jenis Sapi	Jumlah Oosit	Mean \pm SEM (n) fertilisasi pada tahap**			
		1 PN	2PN	>2PN	Fragmentasi
PO	40	33.4 \pm 2.7(15)	42.3 \pm 2.8(19)	4.4 \pm 0.3(2)	2.1 \pm 0.1(9)
SimPO	50	32.1 \pm 2.1(16)	36.2 \pm 1.8(18)	6.0 \pm 0.2(3)	2.6 \pm 0.2(13)
LimPO	52	34.7 \pm 2.8(18)	32.7 \pm 2.3(17)	7.7 \pm 0.2(4)	2.5 \pm 0.5(13)

* Tiap perlakuan dalam penelitian ini diulang sebanyak lima kali, presentase disajikan dalam bentuk Mean \pm SEM

** P: Pronukleus

Dalam penelitian ini tingkat fertilisasi oosit diambil dari data ditemukannya

polimorfonuklear (PMN) dari pronukleus jantan dan betina yang terlihat pada pengecatan *aceto orcein* pada 10 jam sesudah inseminasi. Oosit yang tidak terfertilisasi hanya mempunyai 1 PN, sedangkan oosit yang terfertilisasi lebih dari 1 sperma mempunyai lebih dari 2 PN (polispermi) dan oosit terfragmentasi adalah oosit yang tidak mencapai perkembangan metafase II (MII). Tingkat fertilisasi *in vitro* pada oosit sapi PO, SimPO dan LimPO dengan terbentuknya pronukleus dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1 memperlihatkan hasil penelitian tingkat fertilisasi dengan terbentuknya dua pronukleus (2PN) yang diperoleh dari oosit sapi PO, SimPO dan LimPO tidak berbeda ($P > 0,05$). Dalam penelitian ini spermatozoa yang digunakan adalah sperma beku dari sapi Simmental (*Bos taurus*) dan oosit yang digunakan adalah oosit SimPO (*Bos taurus* x *Bos indicus*), LimPO (*Bos taurus* x *Bos indicus*) dan PO (*Bos indicus*). Penelitian sebelumnya yang dilakukan Zi *et al.* (2009), tidak terdapat perbedaan pembentukan 2PN yaitu pronukleus jantan dan betina pada oosit sapi *crossbreeding* (*Bos grunines* x *Bos taurus*). Hal ini berbeda dengan pendapat Goldbard dan Warner (1982), yang mengatakan perkembangan embrio dipengaruhi oleh bangsa pejantan dan betina.

Berdasarkan data diatas tingkat fertilisasi pada sapi PO, SimPO dan LimPO tidak berbeda, hal ini menunjukkan bahwa tingkat fertilisasi oosit tidak hanya ditentukan oleh genetik namun ada faktor-faktor lain yang mempengaruhi fertilisasi. Kegagalan fertilisasi dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain: (1) proses maturasi inti maupun sitoplasma yang kurang sempurna karena kualitas oosit

yang rendah (2) kegagalan spermatozoa melakukan kapasitasi dan reaksi akrosom sehingga spermatozoa tidak mampu membuahi oosit, (3) kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit sehingga terjadi kegagalan pembentukan pronukleus jantan (Crozet *et al.* 1995).

Faktor lain yang juga mempengaruhi kemampuan fertilisasi *in vitro* adalah dihasilkan *Reactive oxygen species*. Spermatozoa mati menghasilkan *Reactive oxygen species* menyebabkan peroksidasi membran lipid, mengurangi fluiditas membran dan fungsi sperma. *Reactive oxygen species* yang tinggi merusak metabolisme spermatozoa pada media fertilisasi *in vitro*. Kim *et al.* (1999) mengatakan *Reactive oxygen species* meningkat di bawah kondisi *in vitro* yang menggunakan CO₂ 5%. Dalam penelitian ini kemungkinan tidak ada perbedaan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* pada PO, SimPO dan LimPO. Hal baru dari data ini bahwa sapi SimPO dan LimPO masih dapat mengalami proses fertilisasi, sehingga masih bisa mengalami perkembangan lebih lanjut.

SIMPULAN

Tingkat fertilisasi oosit secara *in vitro* pada sapi PO, SimPO dan LimPO tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan berkembang sampai stadium blastosis dari oosit sapi SimPO dan LimPO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ruamah Potong Hewan Giwangan Yogyakarta yang telah menyediakan

ovarium untuk penelitian ini serta semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Budiyanto A, Otoi T, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Shimizu R, Watari H and Nagai T. 2006. Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 52: 123-127.
- Crozet, N, M. Dahirel and L. Gall. 2000. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 367-373.
- Elder K, and Dale B. 2011. *In Vitro Fertilization*, (ed) 3th. Cambridge University Press. Pp 50-81.
- Goldbard SB and Warner CM. 1982. Gene affect the timing of early mouse embryo development. *Journal of Biological Reproductions* 27: 419-424.
- Karja NWK, Aqshani WP, Kusumawati YP, Pravitasari VG dan Gustari S. 2010. Fetal bovine serum meningkatkan maturasi inti oosit kelinci setelah dimaturasi secara *in vitro*. *Jurnal Veteriner* 11 (3): 173-178
- Zi XD, Yin RH, Chen SW, Lian NG, Zhang ND and Guo CH. 2009. Developmental competence of embryos derived from reciprocal *in vitro* fertilization between Yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*). *Journal of Reproduction and Development* 55: 5.