

Pengaruh Ukuran Ovarium Dan Diameter Oosit Terhadap Kualitas Morfologi Oosit Sapi Bali-Timor Yang Dikoleksi Secara *In Vitro*
(The Effect Of The Size Of The Ovaries And Oocytes Diameter To The Quality Of The Oocyte Morphology Of Bali-Timor Cattle That Were Collected By In Vitro)

Hermilinda Parera

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

ABSTRACT

One of the reproductive technology in cattle which growing rapidly is *in vitro* fertilization techniques for *in vitro* embryo production. Environmental factors that influence the *in vitro* embryo development is the diameter of oocytes and ovarian size. Currently, the amount of research on Bali-Timor cattle is still lacking, especially in reproduction technology. Kune and Solihat (2007) states that the Bali-Timor cattle have a high fertility rate up to 60-70%. Application of *in vitro* reproduction technology can improve the genetic quality of livestock by using gametes cells collected from animals. The purpose of this study was to determine the effect of the size of the ovaries and oocytes diameter to the quality of the oocyte morphology of Bali-Timor cattle that were collected by *in vitro* technique. Oocytes samples of Bali-Timor cattle derived from ovarian which obtained from the slaughter house. Furthermore, the ovaries were grouped based on the size of the ovary, i.e group I ($\leq 1,5$ cm); group II (1.6 to 2 cm) and group III ($\geq 2,1$ cm). Oocytes produced from the ovarian then grouped based on the diameter of the oocytes, i.e group I (110-150 μ m); group II (151-200 μ m); group III (201-250 μ m); group IV (251-300 μ m); Group V (301-350 μ m) and group VI ($\geq 351\mu$ m). The results showed that the quality of the oocyte morphology did not differend significantly ($P > 0.05$) on ovarian size. Oocyte quality category A (29.78%) and category B (42.55%) were obtained from group III ovarian higher than group II (25% category A, category B 36%) and group I (category A 19.23 %, category B 26.92%), while the diameter of the oocytes had no effect on the percentage of morphological quality of oocytes produced *in vitro*.

Keywords: oocyte diameter, ovary size, East Bali cattle, *in vitro*

PENDAHULUAN

Pulau Timor memiliki potensi ternak lokal, yakni sapi Timor atau yang dikenal sapi Bali Timor. Sapi Bali dikatakan sebagai sapi yang paling superior dalam hal fertilitas dan angka konsepsi (Toelihere *et al.*, 1996). Dalam penelitian Kune dan Solihat (2007), sapi Bali-Timor memiliki kesuburan yang

tinggi 60-70%. Tingkat kesuburan sapi Bali berkisar 83-86% (Darmadja, 1980).

Ketersediaan Pakan dan kondisi iklim yang baik sangat mempengaruhi performans reproduksi seperti keberhasilan kebuntingan dan kualitas gamet yang dihasilkan dalam hal ini kualitas dari oosit juga menentukan

keberhasilan fertilisasi (pembuahan).

Walaupun berada dalam kondisi alam yang cukup ekstrim, dengan musim kemarau lebih panjang dari musim hujan dan kurangnya ketersediaan pakan namun tingkat kesuburan pada sapi Bali Timor masih cukup tinggi (Kune dan Solihat, 2007).

Dewasa ini peningkatan produksi sapi dipercepat dengan penerapan berbagai teknologi dibidang peternakan baik itu teknologi pakan maupun reproduksi. Terkait dengan reproduksi salah satu perkembangan teknologi dalam reproduksi hewan adalah fertilisasi *in vitro* yang merupakan bagian dari produksi embrio *in vitro*. Teknologi ini merupakan upaya peningkatan produktivitas ternak termasuk sapi. Perkembangan embrio secara *in vitro* dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Faktor genetik dipengaruhi oleh induk dan pejantan sedangkan faktor lingkungan dipengaruhi oleh diameter

oosit, ukuran ovarium, metode aspirasi. Saat ini penelitian pada sapi Bali Timor masih kurang terutama dalam bidang teknologi reproduksi. Aplikasi teknologi reproduksi dapat meningkatkan mutu genetik (Vivanco-Mackie, 2001), dan memungkinkan hewan dengan mutu genetik tinggi untuk memproduksi anak lebih dari kapasitasnya (Baldassarre dan Karatzas, 2004). Peningkatan mutu genetik hewan secara *in vitro* dapat memanfaatkan sel gamet yang dikoleksi dari hewan yang masih hidup maupun telah mati. Oosit yang dikoleksi dari ovarium yang memiliki bentuk dan ukuran ovarium berbeda-beda setiap spesies hewan, pada sapi ovarium berbentuk oval dan bervariasi dalam ukuran, panjang dan lebar memberikan jumlah serta morfologi oosit yang berbeda (Toelihere, 1979). Penelitian ini memberikan gambaran bagaimana hubungan ukuran ovarium dan diameter oosit terhadap kualitas morfologi oosit dari sapi Bali Timor yang dikoleksi secara *in vitro*

MATERI DAN METODE

Ovarium sapi Bali Timor diperoleh dari Rumah Potong Hewan. Ovarium dipisahkan dari jaringan dan lemak dicuci dengan NaCl 0,9% steril yang telah diberi antibiotik. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam termos yang berisi medium NaCl 0,9% yang telah diberi antibiotik dengan suhu 35 - 37°C tidak lebih dari 2 jam setelah pembedahan. Perlakuan pertama ovarium dikelompokkan berdasarkan ukuran ovarium kelompok I ($\leq 1,5$ cm); Kelompok II (1,6-2cm) dan kelompok III ($\geq 2,1$ cm). Perlakuan kedua dari oosit yang dihasilkan dari ovarium yang berbeda dikelompokkan berdasarkan diameter oosit Kelompok I (110-150 μ m); Kelompok II (151-200 μ m); Kelompok III (201-250 μ m); Kelompok IV (251-

300 μ m); Kelompok V (301-350 μ m) dan Kelompok VI (≥ 351 μ m). Koleksi oosit menggunakan teknik aspirasi dari folikel yang berukuran 2-6 mm dengan menggunakan jarum 18 G yang dihubungkan dengan *Syringe disposable* 5 ml yang berisi 0,5-1 ml. Cairan yang diperoleh dari folikel ditampung dalam tabung yang terpisah yang telah ditambahkan PBS 5 mL, endapkan di dalam *waterbath* pada suhu 37°C setelah 15 menit supernatan dibuang, perlakuan ini diulang sebanyak dua kali, kemudian dilakukan pencarian oosit di bawah mikroskop stereokopis dengan menuangkan endapan tersebut pada cawan petri steril yang telah diberi garis-garis

kotak pada bagian dasar cawan petri (0,5 x 0,5 cm).

Evaluasi:

Diameter dan Morfologi Oosit

Diameter oosit diukur menggunakan mikrometer *eyepiece*, dan morfologi oosit dikategorikan atas 4 kelompok seperti yang diklasifikasikan oleh Lonergan *et al.* (1992), yaitu:

Kategori A: Complete, terdapat sel-sel kumulus oophorus, terdiri lebih dari 3 lapisan tebal (5 lapisan), oosit kelihatan kompak

Kategori B: Expanded, terdapat sel-sel kumulus oophorus, terdiri dari 3-5 lapisan tebal, dengan salah satu bagian tidak utuh.

Kategori C: Partial, terdapat hanya 2 lapisan sel-sel kumulus oophorus.

Kategori D: Nude, tidak ada sel-sel yang mengelilingi oosit, oosit

hanya dikelilingi zona pellucida secara merata.

Berdasarkan morfologi oosit tersebut, maka oosit dikelompokkan lagi menjadi:

- 144
1. Oosit kategori baik, yakni oosit dengan morfologi *complete* dan *expanded*.
 2. Oosit kategori sedang, yakni oosit dengan morfologi *partial*.
 3. Oosit kategori buruk, yakni oosit dengan morfologi *nude*.

Analisis Hasil

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan lima kali ulangan. Data yang diperoleh tentang perbedaan ukuran ovarium dan diameter oosit dianalisis dengan menggunakan analisis varians satu arah. Analisis data dilakukan dengan *software* SPSS 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Ukuran Ovarium Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Timor

Berdasarkan tabel 1 kualitas oosit tidak memiliki perbedaan ($P > 0,05$) terhadap ukuran ovarium. Kelompok III menghasilkan oosit dengan kualitas atau kategori A 29,78%, kategori B 42,55% lebih banyak dari kelompok II kategori A 25%, kategori B 36%) dan kelompok I kategori A 19,23 %, kategori B 26,92%. Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas morfologi oosit adalah umur, ukuran ovarium, jumlah folikel antral, aliran darah stromal ovarium dan petanda hormonal seperti *follicle stimulating hormone* (Adnyana,

2006). Menurut Gordon (2003), ukuran ovarium tidak mempengaruhi jumlah oosit yang dihasilkan, namun jumlah dan kualitas oosit dipengaruhi oleh jumlah folikel yang terdapat pada ovarium. Lebih lanjut Martino *et al.* (1994) mengatakan folikel dengan ukuran sedang 3-6 mm menghasilkan kualitas oosit yang baik lebih tinggi dari folikel ukuran sedang hal ini disebabkan karena meningkatnya kualitas oosit pada folikel besar disebabkan oleh lingkungan intrafolikuler yang dapat memperbaiki kualitas oosit. Lingkungan intrafolikular mengandung hormon steroid dan peptida, faktor-faktor pertumbuhan, sitokin, dan molekul-

molekul lain yang mempengaruhi oosit dan perkembangan folikel



Gambar 1a. Pengukurarn ovarium sapi Bali Timor.



Gambar 1b. Folikel dan Ovarium sapi Bali Timor.

Penilaian terhadap kualitas oosit sebagai salah satu upaya melakukan seleksi terhadap oosit yang akan dimaturasi sangat mempengaruhi keberhasilan produksi embrio *in vitro*. Morfologi oosit berdasarkan kekompakan dan jumlah lapisan sel kumulus berakibat positif terhadap maturasi, fertilisasi dan pertumbuhan serta perkembangan embrio *in vitro* (de Wit *et al.*, 2000; Bilodeau Goeseels dan Panich, 2002). Tidak satu pun oosit gundul mampu mencapai embrio tahap 8-16 sel (Khurana dan Niemann, 2000).

Kualitas oosit memberikan pengaruh terhadap pematangan oosit (*maturasi*), perkembangan dan kemampuan embrio untuk tetap bertahan hidup dan pemeliharaan pada kebuntingan dan perkembangan fetus (Krisher, 2004). Penentuan kualitas oosit dapat dilakukan dengan melakukan beberapa evaluasi terhadap oosit yang akan digunakan pada proses fertilisasi *in vitro*. Seleksi oosit yang banyak digunakan adalah pemilihan oosit berdasarkan morfologi sel kumulus yang berada di sekitar oosit (Alvarez *et al.* 2009; Lonergan *et al.*,1996). Teknik *grading* dengan mengevaluasi sel-sel

kumulus oosit yang kompleks dapat mengidentifikasi kualitas oosit dengan lebih mudah dan objektif. Keberadaan sel kumulus mendukung pematangan oosit sampai pada tahap *metafase II* dan berkaitan dengan pematangan sitoplasma yang diperlukan untuk kemampuan perkembangan setelah fertilisasi. Umumnya oosit dengan kumulus yang *multilayer* digunakan dalam produksi embrio secara *in vitro*. Menurut Gordon (2003), kriteria pemilihan oosit yang berkualitas baik dapat dilihat dari bagian ooplasma yang homogen, sel kumulus yang kompak mengelilingi zona pelusida.

Pengaruh diameter oosit terhadap kualitas morfologi oosit sapi Bali Timor

Sebanyak 268 oosit diaspirasi dari 83 ovarium sapi Bali Timor dan dikelompokkan berdasarkan diameter oosit. Ada 6 kelompok diameter oosit yaitu: kelompok I (110-150µm) Kelompok II(151-200µm); Kelompok III (201-250µm); Kelompk IV (251-300µm); kelompok V (301-350µm) dan Kelompok VI (≥ 351µm). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara diameter oosit dan kualitas morfologi oosit sapi Bali Timor

yang dihasilkan, seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Jumlah oosit yang diperoleh berdasarkan perbedaan ukuran ovarium pada sapi Bali Timor

Jumlah Ovarium	Ukuran Ovarium (cm)	Jumlah oosit	Kualitas oosit (%)			
			A	B	C	D
27	≤ 1,5	98	23(13,04)	29(16,09)	20(11,06)	26(15,01)
45	1,6-2	171	33(19,02)	52 (30,02)	50(29,01)	36(20,09)
33	≥ 2,1	131	34(19,08)	50 (29,01)	26(16,03)	19(11,0)

Keterangan: ^{a, b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,05)

Tabel 2. Kualitas morfologi oosit yang diperoleh berdasarkan perbedaan ukuran diameter oosit pada sapi Bali Timor

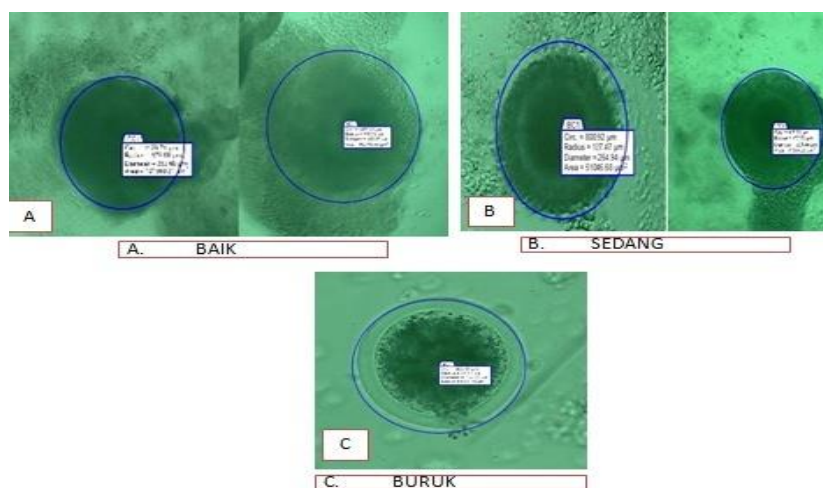
Diameter Oosit	Jumlah oosit	Kualitas Morfologi oosit (%)		
		Baik	Sedang	Buruk
110-150µm	76	3(3,9)	5(6,6)	18(23,7)
151-200µm	34	2(2,6)	4(5,03)	19(25,0)
201-250µm	35	1(1,3)	5(6,06)	21(27,6)
251-300µm	25	1(1,3)	16(21,1)	6(7,9)
301-350µm	15	2(2,6)	7(9,02)	4(5,3)
≥ 351µm	23	5(6,6)	13(17,01)	2(2,6)

Tabel 2 menunjukkan diameter oosit tidak berpengaruh pada jumlah persentase kualitas morfologi oosit yang dihasilkan. Oosit kualitas Baik yang dihasilkan masing-masing kelompok, yaitu Kelompok I (3,9%,) kelompok II (2,6%), kelompok III (1,3%,) IV (1,3%,) kelompok V (2,6%) dan kelompok VI (6,6%). Sapi Bali-Timor menghasilkan oosit dengan diameter yang bervariasi dari 110 µm sampai >351µm. Oosit dalam ovarium sapi Bali betina mempunyai diameter yang berbeda-beda. Gordon

(2003), mengelompokkan diameter oosit sapi menjadi < 100 µm, 100–110 µm, 110–120 µm dan >120 µm. Perbedaan diameter oosit akan berpengaruh terhadap perkembangan oosit mulai dari perkembangan dini sampai pada tahap blastosis. Pengaruh diameter oosit terhadap kemampuannya untuk berkembang mungkin berhubungan dengan lama pembentukan *polar body* pertama. Semakin cepat polar body pertama terbentuk (matang lebih awal) akan meningkatkan keberhasilan dalam

pembentukan blastosis (Dominko dan First, 1992). Salah satu faktor yang menentukan kualitas oosit adalah diameter oosit. Oosit yang matang lebih awal cenderung pada oosit yang memiliki diameter lebih besar (Arlotto *et al.*, 1996). Oosit yang mempunyai diameter lebih besar akan mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk mencapai meiosis I. Menurut Hyttel, *et al.*, (1987) bahwa pada

sapi oosit yang berdiameter 100 µm memiliki kemampuan untuk memulai meiosis dan oosit dengan diameter 110 µm memiliki kemampuan penuh untuk menyelesaikan pematangan dan untuk mempertahankan perkembangan embrio. Oosit dengan diameter > 120µm memiliki kemampuan mencapai metafase II dibandingkan oosit dengan diameter < 100 µm dan 100–110 µm.



Gambar 2. Diameter oosit dari ovarium sapi Bali Timor (a) oosit sapi Bali Timor Kualitas Baik (b) oosit sapi Bali Timor kualitas Sedang (c) oosit sapi Bali Timor kualitas Buruk (gambar ini dilihat dan diukur dengan mikroskop stereoskopis).

Pertumbuhan oosit ditandai dengan peningkatan diameter oosit dan pertumbuhan ukuran dari organel-organel seperti kompleks golgi, retikulum endoplasmik halus, butir lemak,

peningkatan proses transkrip untuk sintesis protein. Tahap pematangan oosit ditandai dengan beberapa proses perkembangan inti oosit (Hafez and Hafez, 2000).

SIMPULAN

Kualitas morfologi oosit tidak memiliki perbedaan ($P>0,05$) terhadap berbagai ukuran ovarium. Kualitas oosit kategori A (29,78%) dan kategori B (42,55%) yang diperoleh dari ovarium kelompok III lebih banyak dari kelompok II (kategori A 25%, kategori B 36%) dan kelompok I (kategori A 19,23 %, kategori B 26,92%),

sedangkan diameter oosit tidak berpengaruh terhadap persentase kualitas morfologi oosit yang dihasilkan secara *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian lanjutan berkaitan dengan kemampuan perkembangan oosit sapi Bali-Timor yang diperoleh dari ukuran ovarium dan diameter oosit yang berbeda hingga stadium blastosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ruamah Potong Hewan Kupang yang telah membantu penelitian ini, serta

semua pihak yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana, IB. Putra. 2006. Hubungan Jumlah Folikel Antral Dengan Respon Ovarium terhadap Stimulasi Ovulasi. *Jurnal Penyakit Dalam*. Vol 7:3
- Arlotto, T., J.L. Schwartz, and N.L. First. 1996. Aspect follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45:943-956.
- Alvarez , A.M., Garcia. G. RM., Rebollar, P.G., Revuelta. L., Millan. P and Lorenzo PL. 2009. Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology*, 72:612-623.
- Baldassare H, Karatzas CN. 2004. Advanced Assisted Reproduction Technologies(Art) In Goats. *Journal Animal Reproduction Science*,82-83: 255-266.
- Bilodeau-Goeseels, S. and P. Panich 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Journal Animal Reproduction Science*,71 (3-4): 143-155.
- Darmadja, D. 1980. Setengah abad peternakan sapi tradisional dalam ekosistem pertanian di Bali. Thesis. Universitas Padjadjaran: Bandung.
- De Wit, A.A., Y.A. Wurth, T.A. Kruip. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus- oocyte complex *Journal Animal Reproduction Science*, 78(5): 1277-1283.
- Dominko, T. and N. First. 1992. Kinetics of bovine oocyte maturation and is affected by gonadotropins. *Abstrac Theriogenology* 37:203.
- Gordon, I. 2003, Laboratory Production Of Cattle Embryos. Edisi ke-2. Dublin: CAB International
- Hafez, E.S.E., dan B. Hafez. 2000. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: Hafez B and Hafez ESE. Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Philadelphia: Lea and Febiger. pp 68-81.
- Hyttel, P., Fair .T., Callesen. H dan Greve T. 1997. Oocyte Growth, Capacitation dan Final Maturation in Cattle. *Theriogenology*, 47: 22-32.
- Khurana, N.K. and H. Niemann. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54 (5): 741-756.
- Krisher, R. L. 2004. The Effect of Oocyte Quality on Development. *Journal Animal Science* 82: E14-E23.

- Lonergan, P., C. Carolan, A. Van Langendonck, I. Donnay, H. Khatir and Mermillod. 1996. Role of Epidermal Growth Factor in Bovine Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development In Vitro. *Journal Biology of Reproduction*. 54: 1420-1429.
- Kune, P dan Solihat. N, 2007, Tampilan Berahi dan Tingkat Kesuburan Sapi Bali Timor yang Diinseminasi, *Jurnal Ilmu Ternak* 7:1-5
- Lonergan, P., H. Sharif, and I. Gordon. 1992. Effect of time to transfer to granulosa cells monolayer on bovine oocyte developmental following IVM/IVF/IVC. Proceeding of the 8th Conference of the European EmbryoTransfer Association. 178.
- Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M.P. Boland, and I. Gordon. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. and Developm.* 37:48-53
- Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo, and M.T. Paramio. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 41:968-980.
- Toelihere, 1979. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Vivanco-Mackie HW. 2001. Embryo Transfer in Ovine and Caprine. In: Palma G. (ED), *Biotechnology of Reproduction*. Buenos Aires. Ediciones Inta.