

Penelitian

## Kualitas Morfologi Oosit Sapi Peranakan Ongole yang Dikoleksi secara In Vitro Menggunakan Variasi Waktu Transportasi

(*In Vitro Quality of Filial Ongole Bovine Oocytes Collected from Ovary after Transported in Different Transportation Period*)

Agung Budiyanto\*, Sri Gustari, Dito Anggoro, Dwi Jatmoko, Silvana Nugraheni, Eka Wahyu Nugraha, Donata Asta

Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Karangmalang 55862

\*Penulis untuk korespondensi: agung\_bd2004@yahoo.com

Diterima 5 November 2012, Disetujui 11 Januari 2013

### ABSTRAK

Salah satu alternatif usaha peningkatan populasi sapi di Indonesia adalah dengan transfer embrio. Kualitas oosit yang baik akan menghasilkan tingkat pembelahan dan blastosis yang baik. Lama waktu transportasi dari rumah potong hewan (RPH) ke laboratorium merupakan salah satu faktor yang dilaporkan berpengaruh terhadap kualitas oosit. Waktu transportasi yang tepat untuk menghasilkan oosit dengan kualitas morfologi terbaik belum pernah dilakukan untuk ovarium sapi di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama waktu transportasi ovarium terhadap kualitas morfologi oosit sapi yang dikoleksi secara in vitro. Koleksi ovarium dilakukan di RPH, selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan proses koleksi oosit dengan metode aspirasi. Ovarium dikelompokkan berdasarkan waktu transportasinya, yaitu 2, 3, 4, dan 5 jam. Oosit yang diperoleh kemudian dikelompokkan berdasarkan kualitasnya dengan mengklasifikasikan menjadi kualitas A, B, C, dan D. Pada penelitian ini ditemukan adanya perbedaan yang signifikan antara lama waktu transportasi ovarium sapi terhadap kualitas morfologi oosit ( $P < 0,05$ ). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam menghasilkan persentase jumlah oosit dengan kualitas morfologi A dan B yang lebih baik jika dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama lebih dari 2 jam.

**Kata kunci:** sapi, ovarium, waktu transportasi, kualitas oosit

### ABSTRACT

One alternative effort to increase the cattle population in Indonesia is by embryo transfer. The oocyte quality will affect cleavage and blastocyst rates. Transportation time from the abattoir (slaughterhouse) to the laboratory is one of the factors reported to influence the quality of the oocyte. This research was conducted to determine the effect of transportation period to the quality of oocytes collected in vitro in cattle. Ovaries were collected at slaughterhouse, transported to the laboratory for oocyte collection aspiration method. Ovaries are grouped based on the time of transportation 2, 3, 4, and 5 hours. Collected oocytes were evaluated to determine their quality by classifying into quality A, B, C, and D. In this study have found significant differences between the longer transport time to the quality of the morphology of the ovarian oocytes ( $P < 0.05$ ). This study suggests that transportation period affect the quality of oocyte. Ovaries were transported to laboratory for 2 hours had the percentage of oocytes with morphological quality A and B are better when compared with the ovary being subjected to transportation for more than 2 hours.

**Key words:** cow, ovary, transport time, oocyte quality

### PENDAHULUAN

Peningkatan kebutuhan protein hewani yang berasal dari ternak yang terus meningkat setiap tahun

berdampak terhadap kebijakan pemerintah dalam menentukan suatu teknologi reproduksi yang dapat membantu menjamin peningkatan populasi ternak. Data dari Anonim (1999), menunjukkan bahwa

sumbangan terbesar terhadap konsumsi protein hewani berasal dari daging. Peningkatan konsumsi protein hewani tersebut mengakibatkan kenaikan permintaan bibit sapi unggul untuk menghasilkan pedet (bakalan), baik untuk sapi perah maupun sapi potong.

Boediono (2005) menyatakan bahwa salah satu upaya untuk meningkatkan daya guna teknologi transfer embrio (TE) adalah pemanfaatan teknologi produksi embrio secara *in vitro* dan perekayasaan embrio dengan tujuan untuk optimalisasi bibit unggul. Pemanfaatan limbah ovarium dari RPH merupakan salah satu cara untuk menyediakan oosit dalam jumlah banyak dan tidak membutuhkan biaya mahal untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*. Ovarium yang akan dimanfaatkan tersebut harus dibawa ke laboratorium untuk dilakukan proses lebih lanjut, namun karena letak laboratorium fertilisasi *in vitro* (FIV) berada di tempat lain sehingga memerlukan waktu selama transportasi menuju ke laboratorium. Beberapa peneliti melaporkan bahwa waktu transportasi ovarium berpengaruh terhadap kualitas oosit yang dihasilkan. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait hal tersebut dan dapat menentukan waktu optimal untuk ovarium sapi peranakan ongole (PO) sehingga dapat meningkatkan efisiensi produksi embrio *in vitro* di Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu koleksi ovarium, koleksi oosit, dan evaluasi kualitas oosit. Koleksi ovarium dilakukan di RPH Giwangan, Yogyakarta. Ovarium diambil dari hewan yang telah dipotong dan dicuci dua kali dalam tempat yang berbeda dengan larutan 0,9% NaCl fisiologis ditambah dengan antibiotik Penicilin-Streptomycin (Wonder®) pada suhu 35-37 °C. Ovarium kemudian dimasukkan ke dalam termos berisi media yang sama dengan suhu 35-37 °C, selanjutnya dibawa ke Laboratorium Riset Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut setelah penyimpanan ovarium selama 2, 3, 4, dan 5 jam setelah pemotongan.

Koleksi oosit dilakukan dengan metode aspirasi. Setelah sampai di laboratorium, ovarium dimasukkan ke dalam *beaker glass* berisi NaCl fisiologis untuk dicuci kembali. *Beaker glass* yang berisi ovarium tersebut dimasukkan ke dalam *waterbath* dengan suhu 37 °C. Ovarium dalam *beaker glass* dibagi menjadi 4 bagian untuk membedakan waktu aspirasi,

selanjutnya beberapa ovarium diambil dan dikeringkan dengan kertas tisu lalu dilakukan aspirasi menggunakan spuit 10 ml dengan jarum berukuran 18 G.

Cairan folikel dimasukkan ke dalam 4 tabung reaksi berbeda dan dibagi berdasarkan pembagian waktu transportasi, kemudian ditambahkan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sebanyak 5 ml pada masing-masing tabung reaksi dan didiamkan selama 15 menit. Setelah waktu mencukupi, supernatan diambil menggunakan pipet, kemudian ditambahkan 5 ml PBS lagi ke dalam tabung reaksi tersebut dan didiamkan lagi selama 15 menit. Setelah supernatan dibuang, sisa cairan dan endapannya (di bagian bawah tabung reaksi) dituangkan ke dalam cawan petri. Evaluasi oosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 32-64 kali untuk menentukan kualitas oosit.

Penilaian terhadap kualitas oosit yang dilakukan dalam penelitian ini mengacu pada Amer et al. (2008). Kualitas oosit diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu: (i) Kualitas A: Kumulus berlapis padat dengan lebih dari tiga lapisan dan ooplasma homogen; (ii) Kualitas B: Lapisan kumulus padat, satu sampai tiga lapis dengan ooplasma homogen, memiliki penampakan kasar dan zona pelusida yang berwarna lebih gelap; (iii) Kualitas C: Lapisan kumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki lapisan gelap; dan kualitas D (iv) Oosit gundul tanpa lapisan kumulus.

Data berdasarkan pengaruh lama waktu transportasi ovarium yang terbagi menjadi 4 kelompok dianalisis menggunakan metode ANOVA. Data dengan perbedaan  $P < 0,05$  dianggap signifikan.

## HASIL

Pada penelitian ini didapatkan 457 oosit dari 51 ovarium yang dikoleksi menggunakan metode aspirasi dengan perlakuan penyimpanan ovarium selama 2, 3, 4, dan 5 jam pada suhu 35-37 °C setelah pengambilan, seperti terlihat pada Tabel 1. Kemudian oosit dikelompokkan berdasarkan morfologinya seperti pada gambar 1 untuk menentukan kualitasnya.

## PEMBAHASAN

Oosit dengan kualitas A yang diperoleh dari ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam pada suhu 35-37 °C pada peneli-

Tabel 1 Pengaruh lama waktu transportasi ovarium sapi pada suhu 37 °C terhadap kualitas morfologi oosit sapi secara *in vitro*.

Perlakuan (jam)	Jumlah Ovarium	Kualitas Oosit (%)				Jumlah Oosit
		A	B	C	D	
2	16	18 (13,95) <sup>a</sup>	33 (25,58) <sup>a</sup>	31 (24,03)	47 (36,43)	129
3	10	11 (9,57) <sup>b</sup>	14 (12,17) <sup>b</sup>	24 (20,87)	66 (57,39)	115
4	9	5 (7,94) <sup>b</sup>	6 (9,52) <sup>c</sup>	15 (23,81)	37 (58,73)	63
5	16	11 (7,33) <sup>b</sup>	32 (21,33) <sup>d</sup>	21 (14,00)	86 (57,33)	150

superscript yang berbeda di dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan  $P < 0.05$

Tabel 2 Pengaruh lama waktu transportasi ovarium sapi pada suhu 37 °C terhadap kualitas morfologi oosit A dan B yang dikoleksi secara *in vitro*.

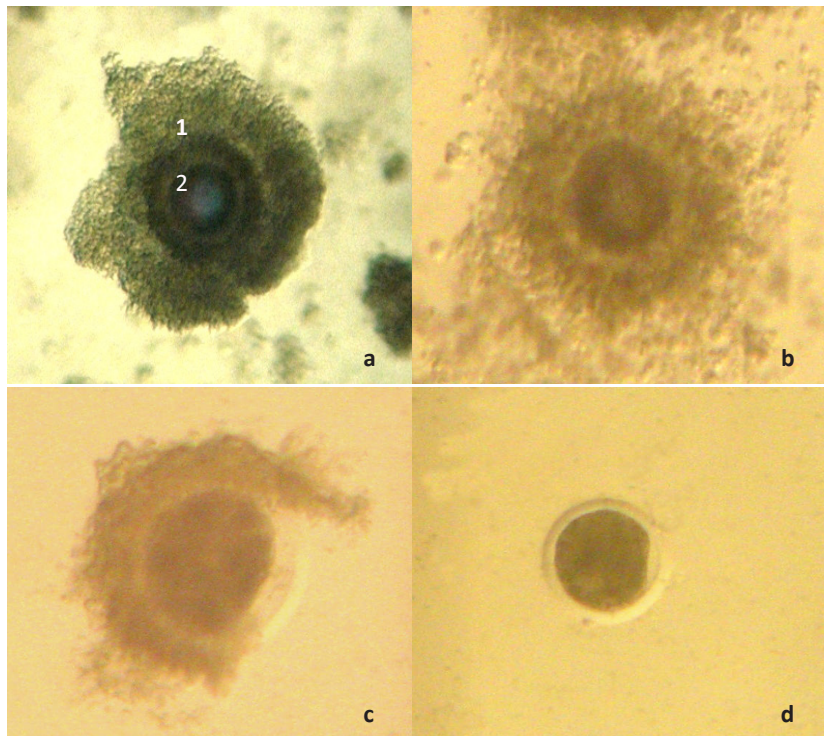
Perlakuan (jam)	Kualitas Oosit		Jumlah Kualitas Oosit A dan B (%)	Jumlah Oosit
	A	B		
2	18 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	51 (39,53) <sup>a</sup>	129
3	11 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	25 (21,73) <sup>b</sup>	115
4	5 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	11 (17,46) <sup>b</sup>	63
5	11 <sup>b</sup>	32 <sup>d</sup>	43 (28,67) <sup>c</sup>	150

superscript yang berbeda di dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan  $P < 0.05$

tian ini lebih tinggi, yaitu 13,95% jika dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 3, 4, dan 5 jam pada suhu 37 °C. Hal ini menunjukkan bahwa apabila waktu transportasi ovarium berlangsung selama lebih dari 2 jam setelah pemotongan sapi, maka akan menurunkan persentase morfologi oosit A yang dapat digunakan untuk proses fertilisasi *in vitro*. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Yang *et al.* (1990) bahwa oosit yang diperoleh dari ovarium sapi, yang disimpan pada suhu 4 °C selama lebih dari 2-24 jam sebelum proses koleksi akan menunjukkan perkembangan oosit yang kurang baik setelah proses fertilisasi. Gordon (2003) juga melaporkan hal yang serupa, yaitu batas waktu yang baik antara pemotongan hewan dan proses koleksi oosit adalah antara 1-2 jam dan suhu yang optimal untuk menyimpan ovarium adalah 30 °C. Lebih lanjut Duran (2008) melaporkan bahwa ovarium yang disimpan selama 3-4 jam setelah pemotongan akan memberikan tingkat pembelahan dan perkembangan blastosis yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan ovarium yang disimpan selama 5-6 jam setelah pemotongan sapi. Oosit yang dapat digunakan untuk produksi embrio *in vitro* adalah oosit dengan kualitas A dan

B. Pada penelitian ini seperti yang terlihat pada Tabel 2, persentase jumlah oosit sapi kualitas A dan B dari ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam pada suhu 35-37 °C adalah 39,53%, sedangkan persentase jumlah oosit sapi kualitas A dan B dari ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 3, 4, dan 5 jam pada suhu 37 °C adalah 21,73%, 17,46%, dan 28,67%. Hal ini menunjukkan bahwa ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam mempunyai oosit dengan kualitas morfologi A dan B lebih tinggi dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 3, 4, dan 5 jam setelah pemotongan sapi. Pernyataan ini diperkuat oleh Nakao dan Nakatsuji (1992), bahwa ovarium yang disimpan pada suhu 37-39 °C selama 5-8 jam akan menurunkan angka maturasi nuklear oosit dan perkembangan blastosis setelah FIV. Lucci *et al.* (2004) lebih lanjut menginformasikan bahwa penyimpanan ovarium yang terlalu lama setelah proses pemotongan sapi akan menurunkan persentase kualitas morfologi oosit yang dihasilkannya.

Johnston dan Wildt (1989) menyatakan terdapat dua faktor penting yang dapat mempengaruhi integritas dan viabilitas oosit pada proses maturasi



Gambar 1 Morfologi oosit hasil koleksi ovarium sapi (a) Oosit sapi kualitas A ditandai dengan kumulus berlapis padat dengan lebih dari tiga lapisan dan ooplasma homogen, (b) Oosit sapi kualitas B ditandai dengan lapisan kumulus padat, satu sampai tiga lapisan dengan ooplasma homogen, memiliki penampakan kasar dan zona pelusida yang berwarna lebih gelap, (c) Oosit sapi kualitas C ditandai dengan lapisan kumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki lapisan gelap, (d) Oosit sapi kualitas D ditandai dengan penampakan gundul tanpa lapisan kumulus, (1) kumulus ooforus, (2) ooplasma oosit (Semua gambar dilihat dengan mikroskop stereoskopis, perbesaran 600x).

in vitro, yaitu penyimpanan ovarium pada suhu 20-37 °C dan waktu koleksi oosit sampai oosit tersebut ditempatkan pada medium kultur yang tepat. Lebih lanjut Klumpp (2001) melaporkan bahwa waktu dan suhu merupakan dua faktor penting yang dapat mempengaruhi kerusakan oosit, sehingga nantinya kualitas oosit akan berpengaruh langsung terhadap kemampuan maturasi nukleus dan pembelahan dalam proses IVF.

Gordon (2003) melaporkan bahwa terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi jumlah oosit yang diperoleh, yaitu suhu dan lama waktu penyimpanan ovarium serta kualitas dan ukuran folikel. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas oosit adalah umur, jenis hewan, siklus estrus, morfologi ovarium, kondisi tubuh dan nutrisi, status reproduksi hewan donor, faktor genetik, dan faktor lingkungan.

Penurunan kualitas oosit kemungkinan juga dapat disebabkan oleh lamanya waktu transportasi ovarium dari RPH menuju ke laboratorium. Lamanya waktu penyimpanan ovarium selama transportasi akan menyebabkan terjadinya kekurangan

suplai darah akibat ovarium telah terpisah dari tubuh hewan. Hal ini menyebabkan hilangnya suplai oksigen dan energi menuju ovarium, sehingga mengakibatkan ovarium dalam kondisi ischemia dan reoksigenasi. Kondisi kekurangan oksigen tersebut menyebabkan ovarium merubah metabolismenya dari aerobik menjadi anaerobik dan hasil akhirnya adalah produk berupa asam laktat yang terakumulasi pada sel-sel ovarium (Petrucci, 1985). Metabolisme anaerobik juga mengakibatkan penurunan *Adenosin Tri Phosphate* (ATP) dan hasil akhir penurunan ini berupa fosfat anorganik, yang selanjutnya akan berikatan dengan H<sub>2</sub>O menjadi asam fosfat. Akumulasi asam laktat dan asam fosfat pada tahap selanjutnya akan menyebabkan penurunan pH folikuler. Apabila penurunan pH folikuler berlangsung terus menerus maka akan meningkatkan jumlah oosit yang mengalami fragmentasi (Petrucci, 1985). Webster et al. (1999) lebih lanjut melaporkan bahwa asidosis, reoksigenasi dan kondisi ischemia berpengaruh kuat terhadap proses kematian sel.

Perhitungan secara statistik menggunakan metode Anova test diperoleh data yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara ovarium yang disimpan selama 2, 3, 4, dan 5 jam terhadap morfologi oosit dengan kualitas A yang dihasilkannya. Hal ini menunjukkan bahwa ovarium yang dibawa dalam transportasi selama lebih dari 2 jam setelah pemotongan sapi dapat mengalami penurunan pada kualitas oosit yang dihasilkannya. Analisa secara deskriptif menunjukkan persentase oosit yang diperoleh terdapat kecenderungan bahwa ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam akan menunjukkan angka persentase yang lebih tinggi pada jumlah oosit kualitas A dan B jika dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 3, 4, dan 5 jam. Penelitian ini telah membuktikan bahwa sebaiknya ovarium segera digunakan sebelum 2 jam atau maksimum 2 jam setelah pemotongan sapi agar mendapatkan hasil yang maksimal pada kualitas oosit A dan B, yang nantinya dapat digunakan dalam proses IVF. Setelah mengetahui pengaruh lama waktu penyimpanan ovarium terhadap kualitas oosit, maka dengan penanganan ovarium dan oosit yang tepat diharapkan dapat meningkatkan efisiensi produksi embrio secara in vitro pada sapi.

Dari data yang diperoleh pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam menghasilkan persentase jumlah oosit dengan kualitas morfologi A dan B yang lebih baik jika dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama lebih dari 2 jam. Disarankan ovarium yang digunakan untuk produksi embrio secara in vitro sebaiknya menggunakan ovarium dengan perlakuan transportasi selama 2 jam setelah proses pemotongan sapi.

*“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.*

## DAFTAR PUSTAKA

Amer HA, Hegab AO, Zaabal SM. 2008. Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, in vitro maturation, and steroid hormone production in buffaloes. *Animal Reproduction* 5: 55-62.

Anonim. 1999. Laporan peluang investasi bidang peternakan di kabupaten pandeglang. Dinas Peternakan Banten.

Boediono A. 2005. Produksi embrio kembar identik melalui bedah mikro pada embrio kambing hasil in vitro. *Jurnal Veteriner* 6(2): 39-46.

Duran DH. 2008. Studies for the improvement of in vitro culture systems of oocytes and embryos in water buffalo. Dissertation. University of Tsukuba, Japan p135-136.

Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos, University Press, Cambridge.

Johnston LA, Wildt DE. 1989. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Research* 24: 343-356.

Klumpp, AM. 2001. The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development. Thesis, Louisiana State University, California. p20.

Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R. 2004. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology* 61: 261-272.

Nakao H, Nakatsuji N. 1992. Effect of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. *Journal of Reproduction and Development* 38: 11-13.

Petruci R. 1985. General chemistry in: principles and modern applications. 4<sup>th</sup> ed. Collier Macmillan Publisher. London.

Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B, Bishopric NH. 1999. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or pH shift and is independent. *Journal Clinical Investigation* 104: 239-252.

Yang NS, Lu KH, Gordon I. 1990. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33: 352.