

Korelasi antara Oosit Domba yang Dikoleksi dari Rumah Pemotongan Hewan dengan Tingkat Fertilitasnya setelah Fertilisasi *in vitro*

Teguh Suprihatin*

**Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP*

Abstract

The objective of this research was to know the correlation of sheep oocytes collected from slaughter house and the fertility oocytes after in vitro fertilization. Data resulted from this research were quantity of oocytes collected from slaughter house and quantity of fertilized oocytes after in vitro fertilization. Data was analyzed, and resulted that coefficient correlation (r) was 0,4959. Conclusion of this research was positive correlation between oocytes collected and oocytes fertilized.

Key words : oocytes, in vitro fertilization, coefficient correlation

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui korelasi antara oosit domba yang dikoleksi dari Rumah Pemotongan Hewan dengan tingkat fertilitasnya setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*. Data yang diperoleh adalah jumlah oosit hasil koleksi dan jumlah oosit hasil fertilisasi. Data kemudian dianalisis sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) sebesar 0,4959. Angka koefisien korelasi ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pemotongan hewan dengan jumlah oosit hasil fertilisasi.

Kata kunci : oosit, fertilisasi in vitro, koefisien korelasi

PENDAHULUAN

Kualitas oosit domba ditentukan berdasarkan kompleks lapisan kumulus oophorus (Cumulus Oocyte Complex) yaitu sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit dalam kondisi utuh (padat) atau tidak. Klasifikasi untuk menentukan kualitas oosit (kualitas baik atau jelek), sampai saat ini kebanyakan masih menggunakan sistem ini.

Penentuan kualitas oosit secara morfologis menurut Monk (1987), dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kualitas baik (kriteria A dan B), kriteria A adalah oosit yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa secara utuh lebih dari 2 lapis. Kriteria B adalah oosit

yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa tidak penuh kurang dari 2 lapis. Kualitas jelek (Kriteria C dan D), kriteria C adalah oosit yang tampak jelas berbentuk bulat tetapi tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Kriteria D adalah oosit yang bentuknya tidak bulat dan tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Oosit dengan kualitas jelek biasanya tidak diikutkan dalam proses kultur selanjutnya.

Oosit yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* terlebih dahulu harus melalui proses maturasi atau pematangan di dalam inkubator selama 24 jam, dengan temperatur sekitar 38,5⁰C (Hunter, 1995).

Tingkat keberhasilan fertilisasi in vitro pada kambing menurut Widjiati, (2002) adalah sangat bergantung pada ukuran diameter folikel ovarium. Faktor lain yang mempengaruhi proses fertilisasi in vitro dan hasilnya menurut Mahaputra, dkk (1996) adalah keadaan lingkungan, media biakan yang digunakan, perlakuan oosit saat maturasi, perlakuan spermatozoa saat kapasitasi, dan pemeliharaan embrio pasca fertilisasi.

Sumber oosit domba untuk fertilisasi in vitro bisa diperoleh dengan sangat melimpah dari rumah pemotongan hewan. Oosit yang diperoleh dari aspirasi ovarium mempunyai kualitas yang beragam.

Oosit yang diperoleh dengan kualitas beragam selanjutnya akan dimaturasi dan difertilisasi secara in vitro, tingkat fertilitas yang akan diperoleh berdasarkan terjadinya pembelahan pada oosit yang terfertilisasi.

Penelitian ini akan mempelajari hubungan antara oosit yang dikoleksi dari rumah pemotongan hewan, yang mempunyai kualitas beragam dengan tingkat fertilitasnya setelah dilakukan fertilisasi in vitro.

METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan di laboratorium in vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian eksperimental ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan faktor tunggal, (Steel and Torrie, 1995).

Oosit domba dikoleksi dari rumah pemotongan hewan dengan cara koleksi

ovarium. Koleksi dilakukan setiap hari sebanyak 4 kali (4 hari). Setiap kali dilakukan koleksi diambil 3 ekor domba betina atau 6 buah ovarium, sehingga total selama penelitian diperoleh 12 ekor domba atau 24 ovarium. Ovarium hasil koleksi selanjutnya disimpan dalam botol steril yang telah berisi *NaCl fisiologis* 0,89 % dan telah ditambah dengan *penicillin* dan *sterptomycin sulfate* sebagai antibiotik. Botol kemudian dimasukkan dalam kontainer dengan temperatur yang dipertahankan pada 30° – 35° C untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Oosit diperoleh dengan cara melakukan aspirasi pada ovarium menggunakan jarum ukuran G20 yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang telah berisi 1 ml *Phosphat Buffer Saline* (PBS) ditambah 50 mg/l *gentamycin* sebagai antibiotik. Oosit hasil aspirasi kemudian ditaruh di dalam cawan petri yang telah berisi PBS dan dicuci sebanyak 3 kali menggunakan media PBS dan 1 kali dalam media *Tissue Cultur Medium* (TCM) 199, dengan tujuan sterilisasi.

Proses selanjutnya setelah pencucian atau sterilisasi adalah menempatkan oosit pada media kultur berupa TCM 199 dalam cawan petri yang telah disuplementasi dengan 0,01 mg/ml *Folikel Stimulating Hormon* (FSH) dan 0,01 mg/ml *Luteinizing Hormon* (LH) serta 50 µg/ml gentamycin sulfate yang dibuat dalam bentuk media tetes (drops) menggunakan *eppendorf*. Setiap media tetes (100 µl) dalam cawan petri dikultur sejumlah oosit yang diperoleh

kemudian ditutup menggunakan mineral oil, selanjutnya dimaturasi dalam inkubator selama 24 jam dengan temperatur dipertahankan sekitar 38,5°C.

Semua oosit yang telah dimaturasi selama 24 jam dianggap sudah siap untuk difertilisasi sehingga segera dilakukan fertilisasi dengan cara menambahkan semen domba segar yang sebelumnya telah diperlakukan dengan diberi pengencer *egg yolk citrate* dan dicuci dengan menambahkan medium *Brickett and Oliphant (BO)* kemudian disentrifuse dengan kecepatan 700 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambahi lagi dengan medium BO kemudian disentrifuse lagi dengan kecepatan 700 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambahi TCM 199 sebanyak 1 cc. Dilakukan evaluasi standar tentang kualitas spermatozoa dan setelah memenuhi standar penilaian maka dilanjutkan dengan memasukkan 1 µl endapan semen ke dalam drop yang telah berisi oosit hasil maturasi.

Semua oosit yang telah difertilisasi dengan menambahkan semen, selanjutnya kembali diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam kemudian diamati jumlah oosit yang berhasil fertilisasi yang ditandai dengan terjadinya pembelahan membentuk 2 sel (tahap embrio 2 sel).

Data yang diperoleh adalah jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pematangan hewan selama 4 hari dan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi. Dari data tersebut kemudian dilakukan penghitungan nilai r untuk mengetahui hubungan antara jumlah

ooisit hasil koleksi dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi.

Uji hipotesis dilakukan dengan mencari nilai t, kemudian dibandingkan dengan tabel distribusi t, pada taraf nyata dengan $\alpha = 0,05$ dan $dk = (n-2)$, nilai r signifikan apabila t hitung berada pada kisaran nilai t tabel ($- t_{tab} < t_{hit} < t_{tab}$) (Sudjana, 1988).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai hubungan (korelasi) antara jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pematangan hewan (12 ekor domba atau 24 buah ovarium) dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hubungan antara jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pematangan hewan (RPH) dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi.

Keterangan	Jumlah Oosit
Koleksi dari RPH	160
Berhasil fertilisasi	116
Nilai hubungan (r)	0,4959
t hit	2,578
t tab (0,05, 22)	2,82
signifikan	- t tab < t hit < t tab

Hasil koleksi oosit dari 12 ekor domba (24 buah ovarium) diperoleh 160 oosit, setelah dilakukan maturasi dan fertilisasi pada semua oosit hasil koleksi, ternyata diperoleh 116 oosit yang berhasil fertilisasi yang ditandai dengan terjadinya pembelahan oosit menjadi 2 sel (embrio tahap 2 sel)

Nilai hubungan (r) antara jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pematangan hewan dengan jumlah oosit yang berhasil

fertilisasi menunjukkan nilai yang positif yaitu sebesar 0,4959. Nilai r yang positif ini dapat diartikan adanya hubungan dimana jumlah oosit hasil koleksi berkorelasi secara linear dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi.

Hasil uji hipotesis nilai r dengan menghitung nilai t hitung diperoleh 2,578 dan t tabel pada α 0,05 dan dk $(n-2) = 22$ diperoleh 2,82. Nilai r signifikan karena hasil t hitungnya berada diantara nilai t tabel.

Nilai hubungan r yang positif antara jumlah oosit hasil koleksi dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi kemungkinan disebabkan oleh kualitas oosit hasil koleksi yang mempunyai kriteria baik.

Penelitian Widjiati (2002), menyatakan bahwa fertilisasi *in vitro* pada kambing akan berhasil baik apabila menggunakan ovarium dengan ukuran diameter folikel 5-7 mm dan 8-12 mm. Ukuran diameter folikel mempengaruhi proses fertilisasi *in vitro* karena oosit yang ada di dalam folikel dikelilingi oleh lapisan kumulus oophorus yang berupa sel-sel granulosa.

Kriteria penilaian kualitas oosit menurut Monk (1987) adalah berdasarkan banyaknya lapisan kumulus oophorus yang mengelilingi oosit. Dari hasil penelitian ini, oosit yang berhasil fertilisasi kemungkinan berasal dari oosit dengan kualitas baik (kriteria A dan B) dimana oositnya dikelilingi oleh 1 atau lebih lapisan kumulus oophorus.

Fungsi sel-sel granulosa pada lapisan kumulus oophorus oosit adalah memberikan suplai nutrisi kepada oosit melalui penjuluran sel kumulus menembus zona pelusida oosit, dengan lebih banyak lapisan kumulus oophorus maka lebih banyak pula sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit dan makin banyak pula oosit menerima suplai nutrisi yang tentu saja akan berakibat pada pertumbuhan oosit menjadi lebih baik sehingga ketika dilakukan fertilisasi maka oosit yang pertumbuhannya lebih baik (berasal dari oosit dengan kualitas baik) akan lebih sempurna dibuahi oleh spermatozoa membentuk zigot dan selanjutnya embrio.

Pada proses perkembangan folikel ovarium dimana terjadi pertumbuhan dan pematangan oosit, akan terjadi peningkatan konsentrasi glukosa, asam piruvat dan asam laktat secara optimum. Suplai nutrisi oosit ini berasal dari sel-sel kumulus yang disalurkan melalui *gap junction* dan digunakan selain untuk pertumbuhan oosit juga dijadikan cadangan energi untuk proses awal pembelahan (Gerrad dkk, 2001).

Sumber energi untuk melakukan proses awal pembelahan pada oosit domba selain berasal dari glukosa juga bisa berasal dari asam amino. Penambahan glutamin pada medium kultur dalam penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan angka keberhasilan fertilisasi. Penambahan glutamin ke dalam medium kultur dapat menggantikan peran Bovine Serum Albumin yang mendukung proses

perkembangan embrio secara in vitro (Eriani dkk, 1994).

Motilitas spermatozoa, kelembaban dan temperatur lingkungan sangat mempengaruhi keberhasilan fertilitas oosit. Oosit yang telah bergabung dengan spermatozoa membentuk zigot akan menjadi sangat aktif berdeferensiasi untuk memulai serangkaian perubahan morfologis dan biokimia.

Fusi antara oosit dan spermatozoa menyebabkan terjadinya pembengkakan inti spermatozoa yang kemudian menjadi pronukleus jantan, sedangkan inti oosit yang dalam keadaan membelah meiosis akan menjadi pronukleus betina, masing-masing dengan kromosom yang haploid. Proses selanjutnya adalah sintesis DNA yang terjadi pada pronukleus jantan dan betina, pronukleus jantan dan betina kemudian bergerak saling mendekati sampai terjadi fusi. Selama proses fusi ini berlangsung selubung inti akan berintegrasi sampai terjadinya proses pembelahan mitosis yang pertama (cleavage) membentuk 2 sel. Kondisi fusi dan pembelahan pertama ini akan berlangsung pada temperatur medium yang dipertahankan pada 30-40⁰C dan kadar CO₂ 5%. Temperatur inkubator yang tidak stabil akan mempengaruhi hasil fertilisasi in vitro (Leese dkk, 199).

Pencucian spermatozoa dengan metode sentrifugasi dan penambahan kafein benzoat dalam medium BO adalah dengan tujuan untuk meningkatkan motilitas spermatozoa dalam menembus

sel-sel granulosa oosit untuk mencapai zona pelusida dan selanjutnya masuk ke dalam sitoplasma oosit (Monk, 1987).

KESIMPULAN

Hasil perhitungan menunjukkan nilai hubungan (r) yang positif antara jumlah oosit hasil koleksi dari rumah pemotongan hewan dengan jumlah oosit yang berhasil fertilisasi secara in vitro, uji hipotesis juga menunjukkan hubungan yang signifikan sehingga dapat disimpulkan bahwa kualitas oosit yang baik pada jumlah oosit hasil koleksi akan mempengaruhi jumlah oosit yang berhasil fertilisasi secara in vitro.

DAFTAR PUSTAKA

- Breeton, B., B. Jalabert., A. Foster and C. Weil. 1993. *Oocyte Maturation in Vertebrates, in: Vertebrates Endocrinology. Fundamental and Biomedical Implication*. Vol. 4, Part A Reproduction. Academic Press Inc. New York. p : 93-96.
- Eriani, K., I. Djuwanita., Muhammad, K., Hasim, E. ., Margawati dan Y. Sukra. 1999. *Pengaruh Penambahan Asam Amino Essensial Dengan dan Tanpa Glutamin dalam Medium Kultur Bebas Serum terhadap Perkembangan Embrio Mencit II In Vitro*. Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia. Malang.
- Gerrad, M., I. Prades., M. Coutry., P. Daels and G. Duchamp. 2001. *Follicular Fluid Concentration of Glucosa, Pyruvate and Lactate In Relation To Follicular Growth, Preovulatory Maturation and Oocytes Nuclear Maturation Stage In The Mare. J. Theerionologi*; p: 372-379.

Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lea and Febiger. Philadelphia; p : 114-121.

Hunter, R. H. F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduction Hewan Betina Domestik*, Terjemahan : D. K. Harya Putra. Penerbit ITB. Bandung. P : 258-266.

Leese, H. J., J. Conaghan, K. Hardy, A. H. Handyside, K. L. Martin dan R. M. L. Winson. 1999. *Gamete and Embryo Quality*. The Parthenon Publishing Group, p : 125-138.

Mahaputra, L.; A. Hinting, H. A. Hermadi, I. Mustofa, S. Utama, dan P. Srianto. 1996. *Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya Dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi Madura*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3, Dirjen Dikti, Depdikbud, Jakarta.

Monk M. 1987. *Mammalian Development a Practical Approach*. IRL PRESS; Washington.

Steel, R. G. D., and J. H. Torrie, 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*, Terjemahan : Bambang Sumantri, P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Sudjana, 1988, *Metoda Statistika*, Penerbit Tarsito, Bandung

Widjiati, 2002. *Follicular Diameter Influences on Oocytes Maturity Level of Goat*. Kongres I dan Seminar Nasional: Bioteknologi Reproduksi, Malang, 30-31 Maret 2002.