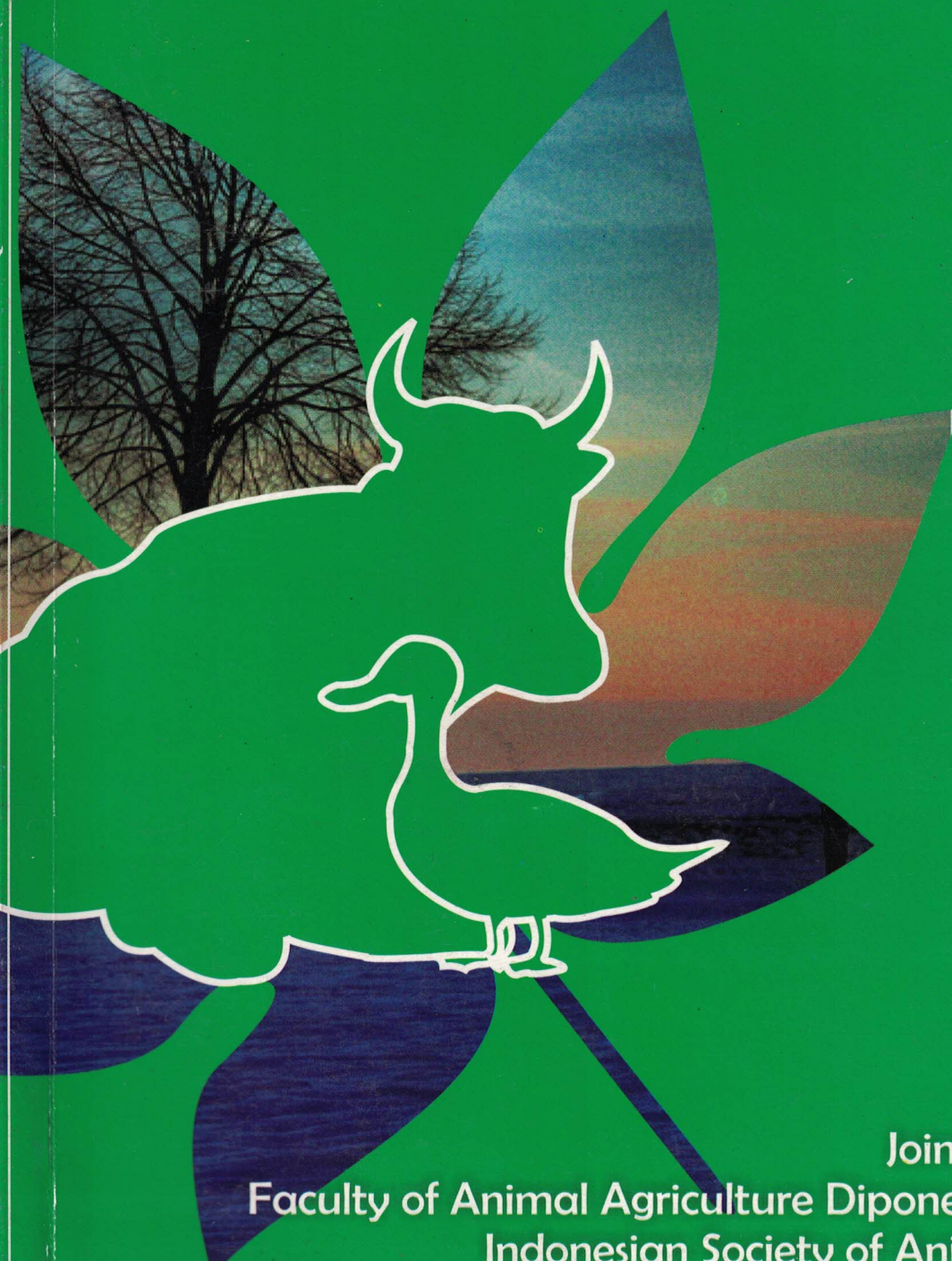


ISBN 978-602-097-243-5

Proceeding of National Seminar on Zootechniques for Indogenous Resources Development

Semarang, 19-20 Oktober 2011

ISAA publication No. 1/ 2012



Jointly published by
Faculty of Animal Agriculture Diponegoro University,
Indonesian Society of Animal Agriculture

Sebelumnya kami mengucapkan terima kasih kepada

Prosiding

Seminar Nasional "Pengembangan Aspek Zooteknis Untuk Mendukung Sumberdaya dan Ternak Lokal"

Hak Cipta © 2012. Indonesian Society of Animal Agriculture

Kampus Drh. Soejono Koesoemowardojo, Kampus Tembalang, Semarang 50275

Tel./Fax: 024-7474750

E-mail: isaa_ina@yahoo.com

Web site: www.isaa.undip.ac.id

Editors: Agung Purnomoadi, Ahmad N Al-Baarri, Aries R Setyawan,
Edy Kurnianto, Joelal Achmadi

Prosiding

Seminar Nasional "Pengembangan Aspek Zooteknis Untuk Mendukung Sumberdaya dan Ternak Lokal",

diselenggarakan di Semarang, 19-20 Oktober 2011

v + 332 halaman

ISBN : 978-602-097-243-5

- Sintesis Protein Sebagai Indikator Kualitas Pertumbuhan Pada Burung Puyuh Diberi Ransum Menggunakan Dedak Fermentasi Diperkaya Kalsium Organik
Suthama, N. dan H.I. Wahyuni 119 – 123
- Efisiensi Protein dan Produksi Karkas Ayam Lokal Umur 10 Minggu Yang Mendapat Pakan Dengan Berbagai Level Protein Pada Periode Pemberian Yang Berbeda
Atmomarsono, U., E. Suprijatna, T.A. Sarjana, Suryanti dan H. Mubarak 124 – 126
- Performans dan Kualitas Telur Ayam Yang Diberi Ransum Mengandung Produk Fermentasi Dengan *monascus Purpureus*
Nuraini, Sabrina dan S.A. Latif 127 – 130
- Implementasi Ampas Sagu Fermentasi Dalam Ransum Ayam Broiler
Rahadi, S., L.M.I. Qalbi, M. Muallimin dan Muchlis 131 – 134
- Potensi Betain Untuk Mensubstitusi Metionin Dalam Pakan Ayam Broiler
Ratriyanto, A., R. Indreswari, Sudiyono dan A. Sofyan 135 – 138
- Produksi Karkas Ayam Kampung Akibat Perbedaan Lama Periode Pemberian Ransum Starter-Grower-Finisher Protein Rendah Berbahan Lokal Inkonvensional
Suprijatna, E., D. Sunarti dan W. Sarengat 139 – 144
- REPRODUKSI**
- Pengaruh *Chicken Embryo Extract* Dalam Medium Yang Mengandung *Calf Serum* Terhadap Pematangan Oosit Domba *In Vitro*
Anwar, S., Y. S. Ondho dan M. I. S. Wuwuh 145 – 150
- Pengaruh Konsentrasi Medroxy Progesterone Acetate Terhadap Persentase Berahi Ternak Kambing PE
Adiati, U. 151 – 154
- Penanganan dan Penyimpanan Ovarium Dari Rumah Pematangan Hewan Sebagai Sumber Oosit Dalam Produksi Embrio *In Vitro* (REVIEW)
Ondho, Y.S. dan S. Anwar 155 – 160
- Profil Kadar *Follicle Stimulating Hormone* dan *Luteinizing Hormone* Pada Induk Sapi Peranakan Ongole Bersejarah Beranak Kembar Secara Alami
Aryogi, E. Baliarti, Sumadi dan Kustono 161 – 164
- Glukosa Darah dan Involusi Uteri Pada Berbagai Paritas Induk Sapi Perah Fries Holland Pasca Partus
Hadisutanto, B., B. Purwantara dan S. Darodjah 165 – 168
- Bobot Lahir Sapi Madura Hasil Kawin Alam dan Inseminasi Buatan Di Peternakan Rakyat
Umar, M., Suparno, D. K. Agustina dan A. Purnomoadi 169 – 172
- Kualitas Semen Segar Sapi Pejantan Pada Suhu Ruang Dengan Lama Simpan dan Penggunaan Pengencer Yang Berbeda
Kusumawati, E.D. dan H. Betu 173 – 175

PENANGANAN DAN PENYIMPANAN OVARIUM DARI RUMAH PEMOTONGAN HEWAN SEBAGAI SUMBER OOSIT DALAM PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO* (REVIEW)

Yon Supri Ondho dan Syaiful Anwar

Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro, Semarang
Kampus Drh. Koesoemowardojo-Tembalang Semarang 50275

ABSTRAK : Ovarium yang diambil dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) dapat digunakan sebagai sumber oosit alternatif yang melimpah dan murah untuk digunakan dalam produksi embrio *in vitro* (IVEP). Akan tetapi, jarak antara RPH dengan laboratorium yang cukup jauh akan membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga penyimpanan ovarium mutlak diperlukan. Penyimpanan ovarium terbukti mengurangi kompetensi perkembangan oosit dibanding ovarium yang masih segar saat digunakan dalam IVEP. Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan tersebut seperti lama waktu, suhu, dan komposisi medium penyimpanan ovarium, keseragaman status folikel ovarium serta spesies yang digunakan. Pada makalah ini diulas mengenai kondisi yang perlu diperhatikan dan dipertimbangkan dalam penanganan dan penyimpanan ovarium RPH agar kompetensi perkembangan oosit dapat dijaga sebaik mungkin untuk dipergunakan dalam IVEP.

Kata kunci : *in vitro*, penyimpanan, oosit, ovarium

PENDAHULUAN

Ovarium merupakan tempat asal mula ribuan hingga ratusan ribu folikel (tergantung spesies) diproduksi yang sekaligus sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya oosit pada mamalia yang secara alami akan berkembang menjadi oosit yang matang dan diovulasikan dalam jumlah ratusan bahkan lebih sedikit selama hidupnya (Gordon, 2003). Melalui serangkaian tahapan dalam teknologi IVEP, oosit tersebut dapat diambil dan dikembangkan menjadi embrio yang lebih banyak, meskipun kompetensi perkembangan oosit hasil *in vitro* tidak sebaik *in vivo* (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987; Squires *et al.*, 2003). Ovarium tersebut banyak ditemukan di RPH yang dapat digunakan sebagai sumber oosit alternatif yang melimpah dan murah untuk keperluan IVEP maupun teknologi reproduksi lanjutan seperti kloning dan lain-lain (Niwa dan Funahashi, 1999; Matsukawa *et al.*, 2007).

Prosedur penyimpanan ovarium merupakan faktor pembatas yang terus diupayakan untuk diperbaiki hingga saat ini. Tujuannya adalah untuk menentukan prosedur yang optimal dan efisien agar oosit yang diambil dari ovarium tersebut mampu berkembang menjadi embrio sebanyak mungkin dengan kualitas sebaik *in vivo* untuk diterapkan pada berbagai spesies. Suhu, waktu transportasi dan penggunaan jenis medium selama penyimpanan ovarium merupakan beberapa faktor yang terbukti berpengaruh terhadap viabilitas dan kompetensi perkembangan oosit yang dikoleksi dari ovarium tersebut baik pada kuda (Love *et al.*, 2003), kambing (Silva *et al.*, 2003), kerbau (Ravindranatha *et al.*, 2003), domba (Matos *et al.*, 2004), babi (Wongsrikeao *et al.*, 2005), sapi (Nagao *et al.*, 2010), maupun unta (Abd-Allah, 2010) dalam IVEP.

Berdasarkan hal tersebut segala aspek mulai dari koleksi ovarium setelah ternak dipotong hingga penanganan selama ovarium dibawa dari RPH ke laboratorium perlu dilakukan dengan prosedur yang benar, tepat serta efisien. Koleksi ovarium sebagai langkah paling awal dari proses IVEP, akan menjadi tahap kritis dan dapat menghambat pada proses berikutnya jika tidak diperhatikan dengan baik. Pada makalah ini akan diulas mengenai kondisi yang perlu diperhatikan dan dipertimbangkan dalam penanganan dan penyimpanan ovarium RPH agar kompetensi oosit dapat dijaga sebaik mungkin untuk dipergunakan dalam IVEP.

Koleksi ovarium dari RPH secara steril

Kondisi ruangan dan proses selama penyembelihan ternak di RPH yang kurang steril dapat menyebabkan kontaminasi mikrobia pada ovarium yang dapat berpengaruh terhadap kualitas oosit di dalamnya. Limbah dari rumen, kotoran ternak yang jatuh dilantai, darah maupun kontaminan lainnya dapat menjadi sumber keberadaan mikrobia. Oleh karena itu, prosedur pelaksanaan yang steril sangat dianjurkan selama proses pengambilan ovarium dari tubuh ternak setelah disembelih hingga diproses di laboratorium. Penggunaan pakaian khusus RPH, sarung tangan serta peralatan yang sudah disterilkan terlebih dahulu akan mengurangi bahaya kontaminasi tersebut.

Sebaiknya setelah diambil dari tubuh ternak, ovarium segera dibersihkan dari darah, jaringan lemak dan jaringan lainnya yang menempel di ovarium sebelum dilakukan penyimpanan. Setelah itu, dicuci dengan medium penyimpanan ovarium yang sudah mengandung antibiotik. Beberapa antibiotik yang sering digunakan untuk kultur *in vitro* adalah *penicillin*, *streptomycin* dan *gentamycin* yang menurut Freshney (2005) berfungsi untuk mencegah kontaminasi dari bakteri gram positif dan gram negatif maupun mikoplasma dan biasanya digunakan dengan dosis masing-masing berturut-turut 100 IU/ml, 100 µg/ml dan 50 µg/ml. Penggunaan kombinasi dari beberapa jenis antibiotik dapat memberi spektrum yang lebih luas terhadap penetrasi berbagai jenis mikrobia.

Lama dan suhu penyimpanan ovarium

Pada dasarnya ovarium yang telah diambil dari RPH, akan semakin baik jika segera diproses di laboratorium dengan harapan kualitas oosit yang akan digunakan dari ovarium tetap terjaga dengan baik. Pada kenyataannya, jarak antara RPH dengan laboratorium yang cukup jauh akan membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga penyimpanan ovarium mutlak diperlukan. Lama dan suhu medium selama penyimpanan menjadi faktor yang berpengaruh terhadap viabilitas dan kompetensi perkembangan oosit.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan masih memberikan hasil yang cukup bervariasi untuk menentukan kondisi yang paling optimal selama transportasi ovarium pada berbagai spesies (Tabel 1). Hal ini kemungkinan selain kondisi ovarium dan kualitas oosit yang heterogen, metode yang digunakan oleh masing-masing peneliti juga berbeda-beda. Menurut Abeydeera (2002), oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran yang berbeda akan menunjukkan kompetensi yang berbeda pula dalam pematangan inti, pematangan sitoplasma dan perkembangan embrio. Meskipun demikian, berdasarkan Tabel 1., dapat disimpulkan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu normal fisiologis tubuh tidak dapat dilakukan dalam waktu yang lebih lama. Selain itu, pada suhu berapapun, kompetensi perkembangan oosit akan semakin menurun seiring dengan lamanya penyimpanan ovarium. Hasil penelitian Nagao *et al.* (2010) memperlihatkan bahwa oosit yang diambil dari ovarium sapi yang disimpan pada suhu 35°C selama 24 jam tidak dapat digunakan untuk penelitian karena banyak yang mati dan tidak dapat menjaga potensi perkembangannya. Pengaruh negatif ini juga diperlihatkan oleh Lin *et al.* (2011), dimana suhu 37°C tidak dapat menjaga kesegaran ovarium babi dalam waktu yang lama karena setelah 6 jam mulai tercium bau tidak sedap yang diduga akibat terjadinya autolisis dan degenerasi pada ovarium. Pada umumnya penyimpanan ovarium selama transportasi dari RPH ke laboratorium pada suhu normal fisiologis tubuh (35-39°C) dilakukan hanya dalam waktu yang tidak terlalu lama (sekitar 1-2 jam) (Goto *et al.*, 1989; Ka *et al.*, 1997, Hou *et al.*, 2006; Park dan Niwa, 2009).

Ketika masih berada di dalam tubuh, proses metabolisme sel-sel di ovarium terjadi pada kondisi suhu normal fisiologis tubuh dengan darah yang selalu mengalir memberikan suplai oksigen, energi maupun sejumlah nutrisi yang penting untuk perkembangan sel. Abd-Allah (2010) menyatakan bahwa sejumlah nutrisi dan oksigen diperlukan oleh oosit yang sedang tumbuh dan aktif dalam mensintesis protein dan RNA serta penggandaan organel-organel sel. Oleh karena ovarium diambil dari tubuh ternak maka berubah dalam kondisi *ischemia* dimana aliran darah akan terhenti sehingga suplai oksigen dan sejumlah nutrisi yang penting untuk perkembangan oosit akan semakin berkurang (Wongsrikeao *et al.*, 2005). Dijelaskan pula

bahwa tidak tersedianya oksigen menyebabkan metabolisme berubah dari kondisi aerob menjadi anaerob dengan dihasilkannya asam laktat dan H^+ . Akumulasi dari H^+ tersebut mengakibatkan pH cairan folikel menjadi lebih asam dan berpengaruh pada kondisi lingkungan disekitar oosit. Gordon (2003) menambahkan bahwa penurunan pH juga terjadi di dalam sel dan dapat mempengaruhi kerja dari *Maturation Promoting Factor* (MPF) dan kelanjutan pembelahan meiosis dalam proses pematangan oosit. Selain itu, Yu (1994) serta Ribanov dan Benov (1981) dalam Wongsrikeao *et al.* (2005) menyatakan bahwa saat kondisi *ischemia* juga akan diproduksi sejumlah metabolit radikal bebas yang beracun (*toxic free oxygen radicals*) yang saat bereaksi dengan protein, lipid dan DNA menyebabkan terjadinya inaktivasi enzim, peroksidasi membran lipid dan perubahan DNA. Kondisi itu pula yang menyebabkan rusaknya sejumlah protein yang dibutuhkan untuk perkembangan embrio *in vitro* hingga tahap blastosis (Nagao *et al.*, 2010).

Tabel 1. Beberapa kondisi terbaik dalam penyimpanan ovarium pada berbagai spesies

Spesies	Jenis medium	Suhu dan lama penyimpanan	IVM (%)	Blastosis (%)	Referensi
Kambing ¹⁾	TCM-199 dan PBS	4°C selama 24 jam	td	td	Silva <i>et al.</i> (2003)
Domba ¹⁾	Garam fisiologis, TCM-199 dan BCS	4°C selama 24 jam 20°C selama 12 jam 39°C selama 2 jam	td	td	Andrade <i>et al.</i> (2001); Matos <i>et al.</i> (2004)
Sapi	PBS	20°C selama 9 jam	-	36,0	Yoko <i>et al.</i> (2003)
	Garam fisiologis	10°C selama 24 jam	67,0	25,0	Matsushita <i>et al.</i> (2004)
	Garam fisiologis	15°C selama 24 jam	91,3	20,4	Nagao <i>et al.</i> (2010)
Babi	PBS	25°C selama 8 jam	65,6-72,6	0-3,5	Lin <i>et al.</i> (2011)
Unta	Garam fisiologis	4°C selama 24 jam 20°C selama 6 jam	80,0 77,7	td	Abd-Allah (2010)

Keterangan :

td : tidak diteliti; PBS : *Phosphate Buffered Saline*; TCM-199 : *Tissue Culture Medium 199*; BCS : *Braun Collin's Solution*.

¹⁾ Parameter yang digunakan hanya pada tingkat morfologi dan ultrastruktural folikel primordial yang normal dan degenerasi

Efek negatif tersebut diatas dapat dicegah lebih lama dengan menyimpan ovarium pada suhu yang lebih rendah dari suhu normal tubuh (subnormal; 20-25°C) dan suhu dingin (4°C) atau bahkan suhu beku (-196°C) karena pada kondisi suhu tersebut proses metabolisme sel akan dihambat sehingga kebutuhan metabolik seperti suplai oksigen, sumber energi dan beberapa nutrisi dapat diminimalisir (Silva *et al.*, 2003; Abd-Allah, 2010). Akan tetapi, penyimpanan tersebut tidak selamanya cocok bagi oosit karena di dalam ovarium terkandung oosit folikular dengan status yang berbeda-beda. Menurut Gordon (2003), selama folikulogenesis dan oogenesis di dalam ovarium, terjadi sejumlah perubahan morfologi dan biokimia sehingga akan ada perbedaan karakteristik mulai saat menjadi sel-sel benih, folikel primordial hingga saatnya diovasulasikan sebagai oosit yang telah matang. Shaw *et al.* (2000) menyatakan bahwa hal tersebut penting sebagai dasar pertimbangan penyimpanan antara oosit yang matang dengan jaringan ovarium pada suhu dingin maupun kriopreservasi seperti disajikan pada Tabel 2. Dikatakan lebih lanjut bahwa prinsip dasar yang harus diperhatikan dalam prosedur penyimpanan adalah bagaimana melindungi sel dari pengaruh pendinginan, pembentukan es intraseluler, dehidrasi dan bahaya racun yang dihasilkan. Karakteristik folikel primordial seperti pada Tabel 2., membuatnya lebih tahan terhadap kerusakan selama penyimpanan dingin

dibanding oosit yang matang. Akan tetapi kelemahan dari folikel primordial ini adalah kondisinya yang masih sangat muda dan harus mengalami sejumlah perlakuan lanjutan untuk bisa matang. Sedangkan oosit yang sudah matang lebih rentan karena dapat terjadi depolimerisasi spindle metafase ketika suhu penyimpanan diturunkan. Alasan tersebut yang menjadikan folikel primordial ataupun folikel preantral memiliki viabilitas yang lebih baik ketika diambil dari ovarium yang disimpan pada suhu dingin (4°C) dibanding suhu normal tubuh (39°C) maupun subnormal tubuh (20°C) dalam waktu yang lama hingga 24 jam (Andrade *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003; Abd-Allah, 2010). Kondisi tersebut berkebalikan untuk oosit yang diambil dari folikel yang sudah tumbuh penuh (Wongsrikeao *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011), bahkan oosit tersebut tidak mampu berkembang hingga tahap blastosis (0%) dari suhu penyimpanan dingin (5°C) (Nagao *et al.*, 2010). Untuk menghindari efek buruk dari suhu dingin digunakan folikel yang berkembang pada tahap awal (tahap GV) karena kromosom terlindungi oleh membran inti (Shaw *et al.*, 2000), ataupun folikel primordial untuk mengeliminasi tingkat variasi dan meningkatkan produksi embrio karena bentuknya lebih homogen dan kejadian atresianya lebih rendah dibanding folikel antral (van den Hurk dan Santos, 2009).

Tabel 2. Karakteristik yang berpengaruh pada sensitivitas terhadap kerusakan selama penyimpanan dingin maupun kriopreservasi

Materi	Oosit primordial	Oosit belum matang berukuran penuh (pada tahap GV)	Oosit matang berukuran penuh (pada tahap MII)
Ketersediaan	Melimpah, selalu ada	Jarang, hanya dari folikel antral	Jarang, hanya ada pada siklus pertengahan
Kemudahan koleksi	Mudah (melalui biopsy)	Prosedur koleksi oosit	Prosedur koleksi oosit
Ukuran	<50 µm	80-300 µm (tergantung spesies)	80-300 µm (tergantung spesies)
Sel-sel pendukung	Sedikit, sangat kecil	Banyak korona/kumulus	Banyak korona/cumulus
Status inti	Istirahat pada tahap Profase I, memiliki membran inti	Istirahat pada tahap GV, memiliki membran inti	Istirahat pada tahap MII, <i>spindle</i> sensitif terhadap suhu, tidak memiliki membran inti
Zona pelusida	Tidak ada	Ada	Ada
Kortikal granula	Tidak ada	Sentral	Peripheral
Lipid intraseluler	Sedikit	Banyak	Banyak
Tingkat metabolik	Rendah	Rendah	Rendah
Rasio permukaan:volume	Tinggi	Rendah	Rendah

Selain status folikel, penggunaan suhu penyimpanan juga perlu mempertimbangkan karakteristik oosit dari setiap spesies ternak yang digunakan. Menurut (Gosden dan Nakano, 2002), oosit babi dan sapi lebih sensitif terhadap pendinginan (*cooling*) dan mempunyai *spindle* yang lebih halus. Pernyataan tersebut didukung oleh Didion *et al.* (1999), bahwa kandungan lipid plasma membran antara sel cumulus dan oosit menyebabkan oosit babi sensitif terhadap pendinginan. Penelitian Lin *et al.* (2011) memperlihatkan bahwa hanya 1,1-3,2% oosit babi dari ovarium yang disimpan pada suhu 37°C yang mampu matang mencapai tahap Metafase II setelah dilakukan IVM. Tingkat IVM tersebut menjadi lebih baik (46,3-72,6%) jika ovarium disimpan pada suhu medium dibawah suhu normal tubuh (18 dan 25°C), dan akan menurun

tajam ketika ovarium disimpan dalam medium bersuhu 4°C (1,1-3,1 %). Bahkan Wongsrikeao *et al.*, (2005) memperlihatkan tidak ada (0%) oosit yang matang dari ovarium babi yang disimpan pada suhu 4°C selama 6 jam. Begitu pula pada sapi, suhu 10-20°C merupakan suhu yang aman untuk penyimpanan ovarium sapi selama 9-24 jam dibanding suhu 0, 5, 25 maupun 30°C (Yoko *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2004; Nagao *et al.*, 2010) karena tidak mengganggu proses sintesis protein pada pematangan inti dan sitoplasma oosit yang dapat dilihat dari tingkat IVM, IVF dan perkembangan oosit hingga tahap blastosis yang paling baik.

Medium transportasi ovarium

Selain waktu dan suhu penyimpanan, jenis medium penyimpanan ovarium juga dapat berpengaruh terhadap viabilitas dan kompetensi perkembangan oosit. Medium tersebut memiliki fungsi sebagai sumber buffer, osmolaritas, suplai energi, elektrolit maupun nutrisi bagi ovarium termasuk oosit yang ada di dalamnya. Beberapa medium transportasi ovarium yang telah digunakan adalah larutan garam fisiologis dan PBS, BCS, dan TCM-199 (Tabel 1). Ada pula yang menggunakan *University of Wisconsin Solution* (UW) (Nagao *et al.*, 2010) dan juga air kelapa (Cordeiro *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006) .

Berbagai jenis medium tersebut memiliki keunggulan dan kekurangan tersendiri. Larutan garam fisiologis adalah yang paling efisien digunakan karena lebih mudah didapatkan dan dipersiapkan serta harga yang murah namun memiliki kandungan nutrisi yang lebih rendah dibanding medium yang lain (Santos *et al.*, 2002). Penggunaannya dalam penyimpanan ovarium tidak lebih baik dari medium lain seperti penggunaan PBS maupun BCS terhadap viabilitas folikel, sel-sel cumulus yang masih hidup dan perkembangan embrio hingga tahap blastosis (Santos *et al.*, 2002 dan Lin *et al.*, 2011). *Braun Collin's Solution* sendiri menurut Silva *et al.* (2000) dalam Silva *et al.* (2003) memiliki sifat hiperosmosis sehingga jika medium tersebut digunakan pada suhu penyimpanan 20°C selama 4 jam atau lebih, dapat meningkatkan folikel yang degenerasi. Medium kultur folikel *in vitro* menggunakan 100% air kelapa tidak mampu menjaga viabilitas folikel menjadi lebih baik (Costa *et al.*, 2006). Dijelaskan lebih lanjut bahwa air kelapa dapat digunakan sebagai medium kultur folikel *in vitro* hanya sebanyak 5-10% yang dicampur dengan *Minimal Essential Medium* (MEM) dan hasilnya juga akan bervariasi tergantung asal dan umur kelapa yang digunakan.

Penggunaan jenis medium yang berbeda akan memberikan hasil yang sama jika ovarium disimpan pada suhu 4°C selama 12-24 jam (Silva *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002). Menurut Santos *et al.* (2002), energi dan nutrisi yang diperoleh folikel pada saat penyimpanan ovarium dapat berasal dari dua sumber yaitu dari folikel itu sendiri dan dari medium penyimpanan ovarium. Dikatakan lebih lanjut bahwa pada suhu dingin (4°C), folikel mampu bertahan cukup dengan sumber energinya sendiri, namun seiring dengan lamanya waktu penyimpanan maka kandungan medium transportasi sangat diperlukan untuk menjaga viabilitas folikel.

Penambahan bahan tertentu dalam medium transportasi ovarium terbukti meningkatkan kemampuan medium tersebut menjadi lebih baik termasuk medium dengan kandungan nutrisi yang rendah. Untuk menekan efek negatif dari *oxygen free radical* selama penyimpanan ovarium, Nagao *et al.* (2010) mencoba menambahkan sejumlah antioksidan seperti 0,3 mM *Glutathione* (GSH) maupun 10 µM *epigallocatechin gallate* (EGCG) ke dalam medium transportasi ovarium berupa garam fisiologis 0,9%. Hasilnya bahwa perlakuan tersebut mampu menjaga integritas kromosom oosit yang normal serta meningkatkan hasil perolehan embrio yang berkembang hingga tahap blastosis dibanding tanpa pemberian antioksidan. Modifikasi medium juga dilakukan oleh Iwata *et al.* (2005) dengan menambahkan 5 mM magnesium, 10 mM rafinosa dan 10 mM sukrosa ke dalam medium PBS pada suhu penyimpanan 20-35°C selama 9 jam dengan hasil bahwa perkembangan oosit yang terjadi lebih baik dibanding tanpa pemberian bahan tersebut. Meskipun modifikasi medium tersebut terbukti memberikan hasil yang lebih baik, namun perlu dipertimbangkan dari segi efisiensi biaya karena harga dari beberapa bahan tersebut yang cukup mahal.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa : 1) penyimpanan ovarium terbukti mengurangi kemampuan perkembangan oosit dibanding ovarium yang masih segar ketika dikultur *in vitro*; 2) belum ditemukan prosedur penyimpanan ovarium RPH yang bisa diterapkan secara optimal untuk semua spesies karena tergantung pada lama waktu, suhu, dan komposisi medium penyimpanan keseragaman status folikel ovarium serta spesies yang digunakan; 3) penyimpanan ovarium diluar tubuh pada suhu normal fisiologis tubuh tidak mampu menjaga kesegaran kondisi ovarium dalam waktu yang lama sedangkan penyimpanan ovarium pada suhu dibawah suhu normal maupun suhu dingin mampu memperlama penyimpanan dan mempertahankan kondisi ovarium lebih baik; dan 4) oosit dari folikel telah tumbuh penuh (tahap GV dan MII) lebih rentan dan sensitif terjadi kerusakan akibat penyimpanan pada suhu dingin maupun suhu beku dibanding oosit dari folikel primordial.

Daftar Pustaka

- Abeydeera, L.R. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. 2002. *Theriogenology*. **57**: 257-273.
- Abd-Allah, S.M. 2010. Effects of storage conditions of dromedary camel ovaries on the morphology, viability and development of antral follicular oocytes. *Anim. reprod.* **7** (2): 65-69.
- Andrade, E.R., A.P. Rodrigues, C.A. Amorim, F.C. Carvalho, M.A. Dode, and J.R. Figueiredo. 2001. Short term maintenance of sheep preantral follicles *in situ* in 0.9% saline and Braun-Collins Solution. *Small Rumin. Res.* **41**: 141-149.
- Cordeiro, M.S., E.H.S. Silva, M.S. Miranda, F.C. Biondi, S.S.D. Santos, and O.M. Ohashi. 2006. The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod.* **3** (3) : 376-679.
- Costa, S.H.F., R.R. Santos, A.P.R. Rodrigues, J.R.V. Silva, J.J.H. Celestino, M.H.T. Matos, E.R. Andrade, F.S. Martins, J.K. Dantas, O.M. Ohashi, and J.R. Figueiredo. 2006. *In vitro* culture of ovine primordial follicles in media supplemented with coconut water. *Anim. Reprod.* **3** (4): 403-409.
- Didion, B.A., D. Pomp, M.J. Martin, G.E. Homanics and C.L. Markert. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* **68**: 2803-2810.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd Ed., CABI Publishing, Wallingford.
- Gosden, R., and M. Nakano. 2002. Preservation of fertility in nature and ART (review). *Reprod.* **123**: 3-11.
- Goto K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* **67**: 2181-2185.
- Hou, J., T. Lei, L. Liu, X. Cui, X. An, and Y. Chen. 2006. Demecolcine-induced enucleation of sheep meiotically maturing oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**: 219–226.
- Iwata, H., T. Hayashi, H. Sato, K. Kimura, T. Kuwayama and Y. Monji. 2005. Modification of ovary stock solution with magnesium and raffinose improves the developmental competence of oocytes after long preservation. *Zygote*. **13** (4): 303-308. (Abstr.)
- Ka, Hak-Hyun., K. Sawai, Wei-Hua Wang, Kyung-Soon Im, and K. Niwa. 1997. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol. Reprod.* **57**: 1478-1483.

- Leibfried-Rutledge, M.L., E. S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey, and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* **36**: 376-383.
- Lin, Y.A., H.B. Tsai, M.H. Liao and M.C. Chen. 2011. Effects of preservation media on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Chinese J. Physiol.* **54** (1): 1-6.
- Love, L.B., Y.H. Choi, C.C. Love, D.D. Varner, and K. Hinrichs. 2003. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*. **59** (3): 765-774 (Abstr.).
- Matos, M.H.T., E.R. Andrade, C.M. Lucci, S.N. Bao, J.R.V. Silva, R.R. Santos, M.A.L. Ferreira, S.H.F. Costa, J.J.H. Celestino, and J.R. Figueiredo. 2004. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*. **62** (1): 65-80 (Abstr.).
- Matsukawa, K., S. Akagi, N. Adachi, M. Kubo, M. Hirako, S. Watanabe and S. Takahashi. 2007. Effect ovary storage on development of bovine oocytes after intracytoplasmic sperm injection, parthenogenetic activation, or somatic cell nuclear transfer. *J. Mamm. Ova Res.* **24**: 114-119.
- Matsushita, S., T. Tani, Y. Kato, and Y. Tsunoda. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim. Reprod. Sci.* **84**: 293-301.
- Nagao, Y., Y. Harada, M. Yamaguchi, A. Igarashi, Y. Ooshima and Y. Kato. 2010. Antioxidant treatment during preservation of bovine ovaries increased the development potential of embryos. *Zygote*. **18**: 315-321.
- Niwa, K. and H. Funahashi. 1999. Recent Development in embryo technology in pigs (Review). *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* **12** (6): 966-975.
- Park, Kwang-Wook and K. Niwa. 2009. Bovine oocyte can be penetrated in modified tris-buffered medium. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **22** (4): 500-506.
- Ravindranatha, B., S. Nandi, H. Raghu, and S.M. Reddy. 2003. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes: effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media. *Reprod. Domest. Anim.* **38**: 21-26 (Abstr.).
- Santos, R.R., J.R.V. Silva, S.H.F. Costa, A.P.R. Rodrigues, R.N.B Lobo, J. R. Figueiredo. 2002. Effect of 0.9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. *Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.* **39** (5): 254-259.
- Shaw., J.M., A. Oranratnachai and A.O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* **53**: 59-72.
- Silva, J.R.V., A.F. Brasil, R.R. dos Santos, S.H.F. Costa, A.P.R. Rodrigues, M.A.L. Ferreira, V.P. Machado, and J.R. de Figueiredo. 2003. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciencia Rural, Santa Maria.* **33** (5): 913-919.
- Squires, E.L., E.M. Carnevale, P.M. McCue, J.E. Bruemmer. 2003. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*. **59**: 151-170.
- van den Hurk, R., and R. Santos. 2009. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. *Anim. Reprod.* **6** (1): 72-95.
- Wongsrikeao, P., T. Otoi, N.W.K. Karja, B. Agung, M. Nii, and T. Nagai. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* **51** (1): 87-97.
- Yoko, O., I. Akira, O. Yasuhiro, N. Yoshifumi, M. Tadami, Y. Yumi, U. Norihiko, H. Toshitaka. 2003. Effect of storage temperature of bovine ovaries on the developmental capacity of oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Hiroshima J. Vet. Med.* **18**: 11-14 (Abstr.).