

**Pengaruh Waktu Fertilisasi dan Sistem Inkubasi yang Berbeda terhadap
Tingkat Fertilisasi Sapi Lokal Secara *In Vitro***

The Effect of Fertilization Time and Different Incubation System on Fertilization Level of Indigenous Cow by In-Vitro

F. L. Syaiful, R. Saladin, Jaswandi, dan Z. Udin

Fakultas Peternakan Universitas Andalas
Kampus Unand Limau Manis Padang 25153
E-mail: ferrylismantonova@yahoo.com

(Diterima: 01 Desember 2010; Disetujui: 28 Januari 2011)

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of fertilization time and different incubation systems on fertilization level by in-vitro. The mature of ovaries from indigenous cow and fresh cement from Holstein Frisian cows (FH), 0.9 % NaCl physiological PBS, Nissui Japan, 1,TCM-199, HEPES 30 µM, 20 mL Heparin, 10% goat serum, 250 g/ml FSH BO medium, medium gentamisain 50 mB-O, mineral oil, alcohol, aquabidest, and 1% aceto orcein were materials and reagents. The Completely Randomized Design (CRD) in factorial pattern was used. Results shown no significant effect on the percentage of fertilized oocytes and level of development of pronuclei (2PN and > 2PN) by different timing of fertilization and incubation system. The development of pronucleus (1PN) showed significant ($P < 0.05$) on 12 hours (37.60 %), but no significant effect on different incubation system. It concluded, the system of incubation and time of fertilization has no effect on oocyte fertilization rate. Oocytes fertilization time can be performed at 6 hours, 12 hours, and 18 hours, while the extension of the period of fertilization until 18 hours did not increase the level of fertilization.

Keywords: Incubation systems, fertilization time, FIV and pronucleus

PENDAHULUAN

Teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan diluar tubuh dalam suatu sistem biakan sel (Hunter, 1995). Teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) dapat menggunakan oosit yang berasal dari hewan yang masih hidup maupun dari oosit hewan yang dipotong, sehingga teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) ini dapat menjadi alternatif produksi embrio dalam pelaksanaan transfer embrio (TE). Manfaat lain dari teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) adalah membuka peluang yang lebih besar untuk mengembangkan teknik manipulasi gamet dan embrio seperti produksi kloning (Gordon, 1994).

Penerapan bioteknologi ini membutuhkan oosit dalam jumlah yang banyak, selanjutnya oosit yang diperoleh dimatangkan secara *in vitro* (*in vitro* maturation) untuk kepentingan fertilisasi *in vitro*. Keberhasilan fertilisasi *in vitro* memerlukan kesiapan yang memadai dari oosit dan sperma secara biologis dan kondisi kultur yang mendukung efektifitas metabolis dari gamet jantan dan betina. Berbagai aspek kondisi kultur seperti medium, waktu inseminasi dan kapasitas, sistem kultur

terus di indentikasi untuk meningkatkan keberhasilan fertilisasi *in vitro* (Bracket dan Zuelke, 1993).

Menurut Herdis (2000), embrio yang dihasilkan dari teknologi fertilisasi *in vitro* dapat di transfer ke ternak resipien untuk membantu percepatan peningkatan populasi ternak. Dengan teknik fertilisasi *in vitro*, pemanfaatan oosit dari hewan yang dipotong merupakan cara produksi embrio yang ekonomis karena dengan cara ini oosit hewan yang dipotong dapat dimanfaatkan untuk dijadikan bakal bibit, hal ini tentu akan terasa sekali nilai tambahnya. Dalam pemanfaatan oosit hewan yang mati belum semua potensi yang ada dapat dimanfaatkan karena terbatasnya daya hidup oosit, sementara teknologi penyimpanan ovarium yang dapat mempertahankan viabilitas oosit dalam waktu yang cukup lama atau selama transportasi belum tersedia.

Untuk meningkatkan fertilisasi dan fleksibilitas produksi embrio *in vitro* dapat dilakukan diluar laboratorium, beberapa penelitian mencoba untuk menggantikan sumber atau peranan CO₂ 5% dalam mempertahankan pH medium. PH

medium dapat dipertahankan dengan menambahkan suatu penyangga seperti Hepes. Menurut Jaswandi (2002), bahwa hasil pematangan dan fertilisasi *in vitro* oosit domba dengan penambahan penyangga Hepes dalam medium dapat memberikan kondisi optimal. Dengan demikian penggunaan straw perlu dikaitkan dengan penambahan penyangga Hepes dalam medium serta waktu inkubasi sehingga efek sinergis penggunaannya dapat dicapai secara optimal.

Komposisi gas udara merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi perkembangan oosit embrio dalam inkubasi. Tingkat maturasi dan fertilisasi oosit serta pertumbuhan embrio terbaik diperoleh pada gas CO₂ 2,5–5% dan O₂ 5% di udara (Pinyopumint dan Bavister, 1995). Sedangkan menurut Thompson (1996), perkembangan embrio sapi tidak mutlak tergantung terhadap CO₂ 5%, hal ini terlihat pada embrio sapi yang mampu berkembang sampai tahap blastosis bila medium ditambah dengan penyangga *zwitter ionic* pada udara tanpa CO₂ 5%. Freshney (1987) mengemukakan bahwa kultur sel dalam tempat terbuka membutuhkan inkubasi dengan CO₂ 5% di udara.

Kedua ini dapat dimanfaatkan sebagai dasar dalam manipulasi CO₂ 5% pada sistem inkubasi. Proses fertilisasi *in vitro* pada sistem inkubasi tanpa gas CO₂ dilapangan dirasakan sangatlah efisien dibandingkan sistem inkubasi CO₂ 5% karena keterbatasan CO₂ dilapangan sangat menghambat proses fertilisasi *in vitro*. Untuk itu diperlukan teknologi yang memungkinkan proses produksi embrio dapat dilakukan selama transportasi atau di luar laboratorium. Kendala utama dalam produksi embrio di luar laboratorium atau selama transportasi adalah keberadaan CO₂ dan tempat fertilisasi. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian mengenai penggunaan sistem inkubasi CO₂ dan sistem inkubasi tanpa CO₂ dan waktu fertilisasi yang tepat terhadap tingkat fertilisasi sapi *in vitro*.

Berdasarkan permasalahan diatas, penulis mengangkat kajian pada sebuah penelitian dengan judul "Pengaruh Waktu Fertilisasi dan Sistem Inkubasi Yang Berbeda Terhadap Tingkat Fertilisasi Sapi Lokal Secara *In Vitro*". Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu terhadap tingkat fertilisasi *in vitro* dan mendapatkan waktu/ periode terbaik fertilisasi *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ovarium sebagai sumber oosit diperoleh dari sapi lokal dewasa. Semen yang digunakan adalah semen segar sapi *Frisian Holstein* (FH) Bahan-bahan yang digunakan adalah NaCl fisiologis 0,9%, *Phosphate Buffered Salline* (PBS; Nissui Jepang), *Tissue Culture Medium- 199* (TCM-199; Sigma, M-5017), Hepes 30 µM (Sigma; H-1617), Heparin 20 µl, *Goat serum* 10%, FSH 250 ml, Gentamisain (Sigma 6-1397) 50mg/ ml, medium *Brackett Oliphant* (B-O), medium modifikasi *Brackett Oliphant* (mB-O), Mineral oil, Alkohol, Aquabidest, dan *Aceto Orcein* 1% (Sigma O-7380). Alat-alat yang digunakan adalah Termos untuk tempat ovarium saat transportasi ke laboratorium, pisau silet untuk *slicing* ovarium, pipet pasteur, pipet eppendorf, inkubator, mikroskop stereo, mikroskop inverted, mikropipet (50 µl dan 250 µl), timbangan elektronik, cawan petri, straw 0,25 ml, pH meter, cover glass, objek glass, tissue, aluminium foil dan vagina buatan untuk menampung semen.

Rancangan percobaan

Rancangan yang digunakan untuk pematangan (maturasi) oosit pada periode inkubasi 24 jam menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data hasil fertilisasi dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3. Setiap perlakuan terdiri atas tiga (3) ulangan, yang masing-masing unit percobaan terdiri atas 10 oosit. Adapun perlakuan tersebut adalah :

- a. Faktor I = Sistem inkubasi terdiri atas dua macam yaitu sistem inkubasi CO₂ 5% dan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%.
Fertilisasi pada 18 jam setelah maturasi.
- b. Faktor II = Waktu fertilisasi terdiri atas tiga perlakuan yaitu:
 - P1 = Waktu fertilisasi pada 6 jam setelah maturasi.
 - P2 = Waktu fertilisasi pada 12 jam setelah maturasi.
 - P3 = Waktu fertilisasi pada 18 jam setelah maturasi.

Prosedur penelitian

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

Koleksi oosit. Untuk koleksi oosit media dasar yang digunakan adalah *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Media disterilkan dalam autoclave pada temperatur 120°C selama 30 menit dan setelah itu disimpan pada temperatur ruangan. Pada hari pengambilan ovarium, media dasar yang disuplementasi dengan 100 IU pennisillin/ ml dan 100 µg streptomisin/ ml. Untuk pematangan digunakan media TCM-199 ditambah dengan *goat serum* 10%. Sterilisasi media ini dilakukan dengan menyaring menggunakan filter millipore 0,22 gm.

Ovarium yang diperoleh di Rumah Potomongan Hewan (RPH) lalu dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi medium NaCl fisiologis 0,9 % yang ditambahkan dengan septomisin 100 µg/ml dan penisillin 100 IU/ ml lalu disimpan dalam termos pada suhu 35°C, kemudian ovarium yang diperoleh dicuci sampai bersih.

Oosit diperoleh dari ovarium sapi, untuk koleksi oosit dilakukan dengan metode penyayatan (*slicing*). Ovarium disayat dalam petridish yang berisi medium *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang disuplementasi dengan *goat serum* 10% dan gentamisin (Sigma, G-1397) 50 µg/ml. Jumlah dan kualitas oosit yang diperoleh diamati dibawah mikroskop. Oosit yang digunakan untuk maturasi adalah oosit kualitas A dan B.

Maturasi oosit. Oosit yang digunakan adalah oosit kualitas A dan B. Prosedur maturasi dilakukan menurut prosedur yang dikemukakan Jaswandi *et al.*, (2003). Oosit kualitas A dan B tersebut lalu dicuci 3 kali dalam medium *Phosphate Buffered Saline* (PBS) selanjutnya oosit dimatangkan dalam medium pematangan (maturasi). Untuk pematangan pada sistem inkubasi CO₂ 5 %, oosit dimatangkan dalam cawan petri pada medium TCM-199 yang disuplementasi dengan *goat serum* 10%, FSH mg/ml dan gentamisin 50 mg/ml. Pematangan pada cawan petri tersebut dibuat empat buah mikrodrip (*droplet*). Setiap mikrodrip (*droplet*) berisi 100 ml medium pematangan TCM-199, kemudian dimasukkan 20 oosit ke dalam mikrodrip lalu dimasukan mineral oil ke dalam cawan petri tersebut.

Selanjutnya masing-masing dari cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5%, lalu di inkubasi pada suhu 38,5 °C selama 24 jam.

Sedangkan untuk pematangan oosit pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% dilakukan dengan menggunakan straw 0,25 ml pada medium TCM-199 + Hepes 30 mM yang disuplementasi dengan *goat serum* 10%, FSH mg/ ml dan gentamisin 50 mg/ ml. Kemudian oosit tersebut disedot kedalam straw dengan cara menempelkan spuit pada ujung straw yang mempunyai kapas. Oosit disedotkan ke dalam straw sebanyak 10-20 oosit/ straw. Oosit di dalam straw ditempatkan sedemikian rupa sebagaimana dengan penempatan semen beku seperti terlihat pada Gambar 1.

Selanjutnya dilakukan maturasi oosit selama 24 jam pada kedua sistem inkubasi (sistem inkubasi CO₂ 5% dan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%). setelah maturasi/ pematangan oosit lalu diamati status oosit tersebut dibawah mikroskop. Oosit yang telah mengalami metaphase-II (M-II) yang akan digunakan untuk difertilisasi.

Kapasitasi sperma. Sperma yang digunakan adalah sperma segar yang diambil dari sapi pejantan *Frisian Holstein* (FH) dengan bantuan vagina buatan. Prosedur pencucian sperma pada kapasitasi sperma dilakukan menurut prosedur Jaswandi *et al.* (2003), yaitu dengan menambahkan 4 ml medium kapasitasi yaitu medium *Brackett Oliphant* (B-O) dan medium modifikasi *Brackett Oliphant* (mB-O) ke dalam tabung sentrifus yang berisi 200 µl semen sapi, selanjutnya dilakukan disentrifugasi selama 10 menit. Pada sistem inkubasi CO₂ 5% menggunakan medium kapasitasi yaitu medium B-O sedangkan tanpa CO₂ 5% medium yang digunakan untuk kapasitasi sperma adalah medium mB-O. Selanjutnya di sentrifugasi 500 G selama 10 menit. Bagian supernatan dari hasil setrifugasi tersebut dibuang, dan endapan sperma hasil pencucian diencerkan sampai konsentrasi 1x10⁷ sperma/ ml dengan menggunakan medium perlakuan yaitu medium (B-O dan mB-O) yang disuplementasi dengan heparin (sigma, H-3125) 20 µl, *goat serum* 10% dan gentamisin 50 µg/ ml lalu di inkubasi pada suhu 38,5 °C selama 30 menit.



Gambar 1. Oosit dalam straw

Fertilisasi *in vitro* oosit. Oosit yang telah matang baik pada kedua sistem inkubasi (sistem inkubasi CO₂ 5% dan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%) masing-masing oosit perlakuan tersebut dicuci tiga kali dengan medium fertilisasi (medium B-O dan medium mB-O) untuk membuang sebagian sel-sel kumulusnya. Sedangkan untuk perlakuan pada sistem inkubasi CO₂ 5% menggunakan medium B-O dan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% menggunakan medium mB-O. PH medium modifikasi B-O (mB-O) diatur dengan menambahkan NaOH 1N sehingga mencapai pH \pm 7,4. Pada sistem inkubasi dengan CO₂ 5% dimasukkan 10-20 oosit ke dalam 50 μ l medium *Brackett Oliphant* (B-O) pada cawan petri lalu ditambahkan dengan 50 μ l semen dengan sperma yang telah mengalami kapasitasi sehingga konsentrasi akhir menjadi 1x10⁶ sperma/ml. Sedangkan pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% oosit difertilisasi dalam straw. Sperma yang digunakan diencerkan sampai konsentrasi 1x10⁶ sperma/ml dengan medium fertilisasi. Oosit dan sperma kemudian disedotkan ke dalam straw, setiap straw terdapat 10-20 oosit. Posisi dan penempatan oosit dalam straw sama dengan pada proses pematangan, seperti yang terlihat pada Gambar 1.

Sedangkan fertilisasi oosit dilakukan selama 6, 12 dan 18 jam yang di inkubasi pada suhu 38,5 °C pada masing-masing sistem inkubasi yang berbeda yaitu sistem inkubasi CO₂ 5% dan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%.

Evaluasi fertilisasi *in vitro*. Untuk melihat tingkat fertilisasi dilakukan dengan cara mengamati perkembangan pronukleus (1 PN, 2 PN dan >2 PN) dengan metode pewarnaan *aceto orcein*. *Prosedur pewarnaan ini berdasarkan Jaswandi (2003)*, sebelum diwarnai terlebih dahulu oosit dibersihkan dari sel-sel kumulus dengan memipet beberapa kali dalam medium *Phosphate Buffered Salline* (PBS), kemudian difiksasi dalam larutan asam asetat dan larutan etanol absolut dengan perbandingan (1:3)

selama 48 jam kemudian diwarnai dengan pewarnaan *aceto orcein* 1% (Sigma, O-7380) selama 10 menit, kemudian status inti oosit tersebut diamati dibawah mikroskop.

Oosit yang mempunyai satu pronukleus (1 PN) diasumsikan oosit hanya terdiri atas pronukleus betina, sedangkan oosit yang mempunyai dua pronuklei (2 PN) diasumsikan terdiri atas pronukleus jantan dan betina. Oosit yang mempunyai lebih dari dua pronuklei (>2 PN) diasumsikan oosit terdiri atas dua atau lebih pronuklei betina dan satu pronukleus jantan, atau sebaliknya. Oosit dikategorikan terfertilisasi apabila mempunyai dua buah atau lebih pronuklei (2 PN dan >2 PN). Variabel yang diamati adalah: persentase fertilisasi *in vitro* dan tingkat perkembangan pronukleus (PN). Data hasil fertilisasi yang diperoleh dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3. Jika terdapat pengaruh yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji DMRT Duncan's Multiple Range Test (Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase fertilisasi *in vitro*

Hasil Penelitian ini menunjukkan rata-rata persentase fertilisasi *in vitro* pada kedua sistem inkubasi yaitu sistem inkubasi CO₂ 5% dan tanpa CO₂ 5% pada ketiga periode inkubasi dapat terlihat pada Tabel 1.

Rataan persentase fertilisasi oosit pada waktu *fertilisasi* 6 jam adalah 63,63 %, 12 jam sebesar 56,31 %, dan 18 jam yaitu 62,12 %. Sedangkan rata-rata persentase fertilisasi oosit pada sistem inkubasi Co₂ 5% adalah 61,46% sedangkan tanpa CO₂ 5% sebesar 59,60% seperti terlihat pada Tabel 1. Tetapi setelah dianalisis secara statistik, persentase fertilisasi oosit menunjukkan penambahan waktu fertilisasi tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap sistem inkubasi yang berbeda.

Tabel 1. Persentase fertilisasi oosit sapi lokal pada waktu fertilisasi dan sistem inkubasi yang berbeda

Sistem Inkubasi (%)	Waktu Fertilisasi (jam)	Jumlah Oosit (buah)	Fertilisasi (%)
1. Dengan CO ₂ 5	6	35	23 (65,71)
	12	23	13 (56,52)
	18	37	23 (62,16)
2. Tanpa CO ₂ 5	6	26	16 (61,54)
	12	41	23 (56,10)
	18	29	18 (62,07)

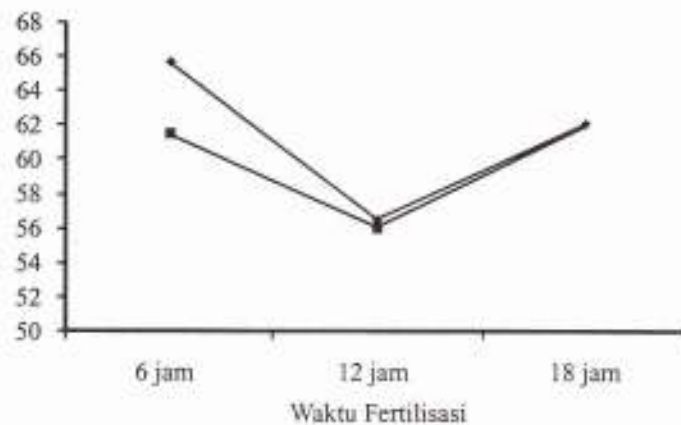
Persentase fertilisasi yang tidak berpengaruh nyata pada sistem inkubasi yang berbeda, hal ini disebabkan oleh adanya suplementasi hepes ke dalam medium mB-O pada sistem inkubasi CO₂ 5% sebagai buffer dalam medium. Ditambah oleh Shamsuddin *et al* (1993), penambahan penyangga Hapes dalam medium serta waktu inkubasi sehingga efek sinergis penggunaannya dapat dicapai secara optimal. Diperkuat oleh Jaswandi (2002), tingkat maturasi oosit *in vitro* penggunaan Hapes 10-30 mM dalam medium cukup efektif pada kondisi tanpa CO₂ 5% baik menggunakan cawan petri maupun straw. Hasil pematangan dan fertilisasi *in vitro* oosit domba dengan penambahan penyangga Hapes dalam medium dapat memberikan kondisi optimal.

Dari hasil penelitian, terlihat pada Gambar 2. tingkat fertilisasi dari ketiga waktu fertilisasi 6, 12 dan 18 jam terhadap sistem inkubasi yang berbeda adalah hampir sama. Sedangkan persentase fertilisasi *in vitro* pada waktu fertilisasi 12 jam mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan penelitian Jaswandi (2002) bahwa tingkat fertilisasi oosit pada domba mengalami penurunan pada periode inkubasi 12 jam. Ditambahkan oleh Rehman *et al* (1994), bahwa fertilisasi pada sapi dengan perlakuan waktu inkubasi kurang dari 16 jam dengan tingkat fertilisasi sebesar 57,16%.

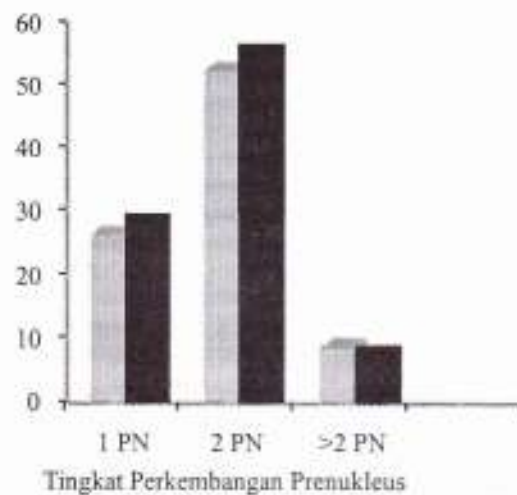
Tingkat fertilisasi yang hampir sama diantara periode inkubasi disebabkan oosit mempunyai mekanisme yang menghambat masuknya sperma lain bila telah terjadinya penetrasi oleh satu sperma. Perpanjangan periode inkubasi sampai 18 jam tidak berpengaruh terhadap tingkat fertilisasi oosit. Menurut Hafez dan Hafez (2000) bahwa setelah terjadinya fertilisasi permukaan oosit mengalami perubahan untuk mencegah fusi sperma lainnya.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa periode inkubasi selama 6 jam telah memungkinkan bagi sperma untuk menembus oosit. Dode *et al.*, (2002) melaporkan bahwa penetrasi oosit oleh sperma diinkubasi selama 6 jam memperoleh tingkat penetrasi sperma 63,3 %. Sedangkan Jiang (1991) memperoleh tingkat monospermia dan polyspermia pada beberapa periode inkubasi setelah inseminasi sperma pada oosit sapi yang dimaturasi *in vitro* adalah sebagai berikut: monospermia pada periode inkubasi 6 jam 45,3 % ; 12 jam 68,6 % dan 20 jam 80,9 %, sedangkan tingkat polyspermia adalah pada periode inkubasi 6 jam adalah 0,0%; 12 jam 9,8% sedangkan 20 jam 12,8%.

Inkubasi oosit dan sperma yang terlalu lama dapat mengurangi kemampuan oosit berkembang karena sperma yang terlalu lama dapat mengurangi kemampuan oosit berkembang karena sperma mempunyai potensi untuk melepaskan enzim hidrolitik kedalam medium fertilisasi (Gordon, 1994). Hasil penelitian dari pengaruh perlakuan terhadap tingkat fertilisasi *in vitro* dari kedua sistem inkubasi pada 3 periode inkubasi dapat dilihat pada Gambar 3. Terlihat pada Gambar 3 tingkat perkembangan pronukleus (1PN) pada sistem inkubasi yang berbeda diperoleh yaitu untuk sistem inkubasi CO₂ 5% yaitu 26,32% sedangkan pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% sebesar 28,13 %. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada 1PN pada sistem inkubasi berbeda ($P > 0,05$). Tingkat perkembangan yang hampir sama diantara kedua sistem inkubasi dikarenakan pada penelitian ini disuplementasi Heparin dengan dosis 20 µg/ml ke dalam medium fertilisasi. Dari hasil penelitian Lu (1990), melaporkan bahwa penggunaan Heparin (10 µg/ml) diperoleh tingkat perkembangan 1 PN sebesar 4,8% sedangkan pada dosis 50 µg/ml (7,3%) dan dengan dosis 100 µg/ml diperoleh 1 PN sebesar 5,2%.



Gambar 2. Persentase fertilisasi in vitro pada waktu fertilisasi dan sistem inkubasi yang berbeda (◊ dengan CO2 5%, ◻ tanpa CO2 5%)



Gambar 3. Tingkat perkembangan pronukleus (1PN, 2PN, dan >2PN) pada sistem inkubasi yang berbeda (◻ dengan CO2 5%, ◼ tanpa CO2 5%)

Tingkat perkembangan pronukleus 2PN kedua sistem inkubasi yaitu pada sistem inkubasi yang menggunakan CO2 5% adalah 52,08 % sedangkan tanpa CO2 5% sebesar 54,77 %. Setelah dianalisis sistem inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap tingkat perkembangan 2PN.

Hasil penelitian yang hampir sama diperoleh dari kedua sistem inkubasi yang digunakan yaitu sistem inkubasi CO2 5% dan tanpa CO2 5%. Hal ini disebabkan karena medium yang digunakan pada

kedua sistem inkubasi tersebut dapat memberikan kondisi yang optimal pada tingkat perkembangan 2PN.

Pada sistem inkubasi CO2 5% menggunakan medium B-O (tanpa Hepes) sedangkan tanpa CO2 5% menggunakan medium mB-O (dengan Hepes). Asumsi ini sependapat dengan Visconti *et al.*, (1999) mengemukakan bahwa keberhasilan fertilisasi pada medium yang mengandung Hepes dan NaHCO₃ hampir sama dengan medium yang mengandung NaHCO₃ tanpa Hepes.

Hasil penelitian Jaswandi *et al.*, (2004) menunjukkan bahwa penggunaan Hepas dapat menggantikan peran CO₂ 5% dalam produksi embrio. Menurut Triwulanningsih (2002), oosit yang dikultur dalam medium TCM-199 selama 18 jam dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 39 0C dapat difertilisasi serta menghasilkan blastosis yang lebih banyak dibandingkan yang dikultur selama 24 jam.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan perkembangan oosit dari kedua sistem inkubasi pada fertilisasi *in vitro* hampir sama. Kecenderungan yang sama mungkin disebabkan oleh tingkat penetrasi sperma pada fertilisasi.

Tingkat fertilisasi disebabkan mekanisme oosit yang mencegah masuknya fusi sperma lainnya yang telah dipenetrasi oleh satu sperma. Kegagalan mekanisme ini akan mengakibatkan kejadian polispermia yang berakhir dengan terbentuknya embrio poliploidi, embrio ini akan mengalami perkembangan abnormal dan mati (Hafez dan Hafez, 2000). Tingkat perkembangan pronukleus >2PN pada berbagai sistem inkubasi yang berbeda yaitu pada sistem inkubasi CO₂ 5% adalah 8,81% sedangkan pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% sebesar 7,51 %. Tingkat perkembangan >2PN pada sistem inkubasi CO₂ 5% lebih tinggi dari sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%. Meskipun terdapat perbedaan tingkat perkembangan pronukleus >2 PN pada kedua sistem inkubasi namun secara analisis statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata ($P>0,05$).

Pada penelitian ini, tingkat perkembangan >2PN tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Jaswandi (2002) mengemukakan bahwa tingkat fertilisasi >2 PN pada oosit domba relatif lebih

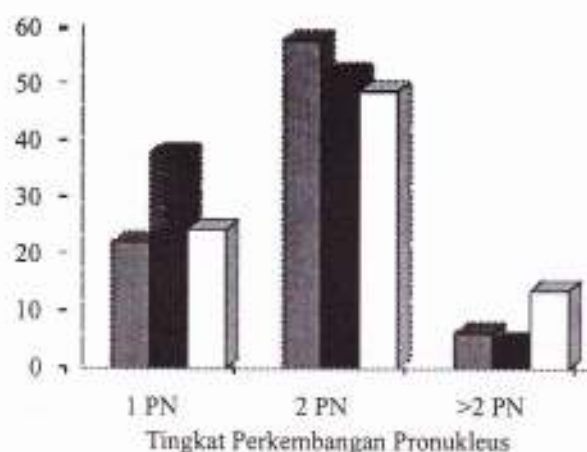
tinggi pada sistem inkubasi CO₂ 5% dalah 9,68% sedangkan pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% sebesar 7,19%.

Tingkat perkembangan pronukleus (PN)

Terlihat pada Gambar 4 tingkat perkembangan pronukleus 1PN terhadap berbagai waktu fertilisasi diperoleh yaitu 6 jam sebanyak 22,03%; 12 jam sebesar 37,60% dan 18 jam yaitu 24,23%.

Pada periode inkubasi 12 jam mengalami peningkatan tingkat perkembangan 1 PN sebesar 15,57%, kemudian pada periode inkubasi 18 jam terjadinya penurunan yang cukup drastis yaitu sebesar 25,48%. Dari hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu fertilisasi sangat berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap perkembangan pronukleus 1PN. Setelah dilakukan uji lanjut DMRT, diperoleh tingkat perkembangan pronukleus 1PN yang tertinggi adalah waktu fertilisasi 12 jam yaitu sebesar 36,84 % kemudian diikuti waktu fertilisasi 18 jam adalah 24,41%. Dari hal diatas diasumsikan perpanjangan waktu fertilisasi sampai waktu 18 jam tidak meningkatkan tingkat perkembangan pronukleus 1PN pada fertilisasi oosit sapi *in vitro*. Diperkuat oleh Jaswandi (2002), mengemukakan bahwa perpanjangan periode fertilisasi sampai 24 jam pada domba tidak meningkatkan keberhasilan fertilisasi oosit *in vitro*.

Tingkat fertilisasi perkembangan pronukleus 2PN pada berbagai waktu fertilisasi diperoleh; pada waktu fertilisasi 6 jam sebanyak 57,42%; 12 jam sebesar 51,70% sedangkan 18 jam yaitu



Gambar 4. Perkembangan pronukleus (1PN, 2PN, >2PN) pada waktu fertilisasi yang berbeda (□ 6 jam, ■ 12 jam, □ 18 jam)

sebesar 48,47%. Setelah dianalisis secara statistik menunjukkan bahwa peningkatan waktu fertilisasi tidak menyebabkan pengaruh yang nyata ($P>0,05$) terhadap perkembangan pronukleus 2PN.

Menurut Jaswandi (2002) bahwa tingkat fertilisasi yang hampir sama sampai periode inkubasi 24 jam disebabkan oleh oosit yang mempunyai mekanisme yang menghambat masuknya sperma berikutnya bila telah dipenetrasi oleh satu sperma.

Tingkat perkembangan pronukleus >2 PN terhadap berbagai waktu fertilisasi diperoleh yaitu: 6 jam yaitu sebesar 6,21 %; 12 jam adalah 4,62 % dan 18 jam adalah 13,66 %. Setelah dianalisis secara statistik menunjukkan bahwa waktu fertilisasi tidak adanya perbedaan yang nyata ($P>0,05$) terhadap perkembangan pronukleus >2PN. Peningkatan periode inkubasi dapat menyebabkan penurunan tingkat perkembangan pronukleus >2PN. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa periode waktu 18 jam efektif digunakan untuk fertilisasi oosit *in vitro*. Dipertegas oleh Chian *et al.* (1992), mengemukakan bahwa sperma masih mampu menembus oosit sampai 24 jam setelah di inseminasi tetapi peningkatan tingkat fertilisasi tidak signifikan, dan juga diikuti peningkatan kejadian polispermia yang cukup tinggi. Peningkatan oosit terfertilisasi setelah perpanjangan waktu fertilisasi juga diikuti peningkatan oosit yang mempunyai lebih dari dua buah pronuklei (>2 PN). Kondisi yang kurang menguntungkan dari perpanjangan periode inkubasi adalah peningkatan persentase fertilisasi dapat disebabkan oleh oosit yang mengalami parthenogenesis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dalam penelitian ini, maka dapat ditarik suatu kesimpulan yaitu sistem inkubasi dan waktu fertilisasi tidak berpengaruh terhadap tingkat fertilisasi oosit. Fertilisasi oosit dapat dilakukan pada periode inkubasi 6 jam, 12 jam, dan 18 jam. Perpanjangan periode fertilisasi sampai 18 jam tidak meningkatkan tingkat fertilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Brackett, B.G, K.A. Zuelke, 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39 : 43-63.
- Chian, R.C., H. Nakahara, K. Niwa and Funahashi. 1992. Fertilization and early Cceavage *in vitro* of aging bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37, 666-672.
- Dode, M.A.N., N.C. Rodovalho, V.G. Ueno and Fernandes. 2002. The effect of sperm preparation and coincubation time on *in vitro* fertilization of *Bos Indicus* oocyte. *Animal Reproduction Science* 69: 15-23.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embrios. *Biotechnology in Agricultural Series*. CAB. International.
- Hafez, B and E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7 th Edition. Lea Febiger. USA.
- Herdis. 2000. Pemanfaatan Ovarium sebagai limbah rumah potong hewan untuk meningkatkan populasi ternak melalui teknik fertilisasi *in vitro*. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2000, Vol. 2, No. 2 hal.1-7.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik* (Peterjemah Harya Putra). Penerbit ITB, Bandung.
- Jaswandi, Z. Udin dan M. Mundana. 2004. Pengembangan Sistem Kultur Tanpa CO2 dalam Produksi Embrio Secara *In Vitro*. Laporan Hibah Bersaing XI. Universitas Andalas.
- Jaswandi. 2003. Kualitas dan Angka Maturasi *In Vitro* Oosit Domba Pada Berbagai Suhu dan Waktu Penyimpanan Ovarium. Laporan Penelitian Dosen Muda. BBI, Dikti. Universitas Andalas.
- Jaswandi. 2002. Penggunaan Hepes dan Butiran Efervesen dalam Sistem Inkubasi Pada Produksi Embrio Domba Secara *In Vitro*. Disertasi Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Jiang, H.S. W.L. Wong., K.H. Lu, I Gordon, and Polge, C. 1991. Roles of cell monolayers in the coculture of *in vitro* fertilization bovine embryos. *J. Theriogenology*, 35, 216.
- Pinyopummintr, T and B.D. Bavister. 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44, 471-477.

- Rehman, N., A.R. Collums, T.K. Suh and R.W. W Junior. 1994. Effects sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 41 : 1447-1465.
- Thompson, J.G 1996. Defining the requirement for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45: 97-100.
- Triwulanningsih, E. 2002. Pengaruh Produksi Sapi Lokal *In Vitro* dengan Modifikasi Waktu dan Suhu Pada Medium Maturasi Yang Diperkaya dengan FSH dan Estradiol 17 β . Disertasi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Shamsuddin, M., B. Larsson and H. Rodriguez-Martinez. 1993. Maturation related change in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science* 31, 49-60.
- Steel, R.G.D and Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Alih Bahasa B. Sumantri, Edition kedua, Cetakan 2. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.