

TINGKAT MATURASI *IN VITRO* PADA OOSIT SAPI SILANGAN SIMMENTAL PERANAKAN ONGOLE DAN LIMOUSIN PERANAKAN ONGOLE

In Vitro Maturation Rate of Bovine Simmental Ongole Crossbred and Limousin Ongole Crossbred Oocytes

Hermilinda Parera¹ dan Agung Budiyanto²

¹Program Studi Kesehatan Hewan Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Kupang

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,

E-mail: milindaparera81@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat maturasi oosit sapi Simmental Peranakan Ongole (SimPO) dan Limousin Peranakan Ongole (LimPO) secara *in vitro*. Oosit dari Ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH), dikelompokkan berdasarkan jenis sapi PO (kontrol), SimPO dan LimPO. Oosit diaspirasi dari ovarium dengan *syringe* 5 ml dan jarum 18 G. Oosit dengan kualitas A dan B yang digunakan dalam penelitian ini. Oosit dikultur dalam media maturasi TCM 199 100 μ l drop dan dilapisi minyak mineral, diinkubasi pada suhu 38,5° C, CO₂ 5% dan kelembaban 95% selama 24 jam. Tingkat maturasi *in vitro* ditentukan dengan pewarnaan *aceto orcein* 1% untuk melihat tahapan maturasi dengan adanya perubahan konfigurasi kromosom dan membran inti berupa *germinal vesicle*, *germinal vesicle breakdown*, metafase I, anafase/telofase I, dan metafase II. Hasil penelitian menunjukkan tingkat maturasi *in vitro* oosit yang mencapai metafase II dari oosit sapi PO lebih tinggi secara signifikan dibandingkan sapi SimPO dan LimPO.

Kata kunci: tingkat maturasi, metafase II, SimPO, LimPO

ABSTRACT

The aims of this research was to determine *in vitro* maturation rate of SimPO and LimPO oocytes. Ovaries from local abattoir grouped into PO (control), SimPO and LimPO. Cumulus-oocyte complexes were aspirated from ovaries with a 5ml syringe fitted with an 18 gauge needle. Cumulus-oocyte complexes quality A and B were used for this research. Cumulus-oocyte complexes were cultured in the maturation medium TCM 199 droplets 100 μ l and under a layer of mineral oil at a 38.5° C, with 5% CO₂ and 95% humidity for 24 hours. *In vitro* maturation rate was determined by staining with 1% aceto orcein to see stage of oocyte maturation by observing the changes in chromosome configuration and the nuclear membrane Germinal vesicle, Germinal vesicle breakdown, metaphase I, anaphase I, telophase I, and metaphase II. These results indicate that oocytes *in vitro* maturation rate reaching metaphase II in PO was significantly higher than those of SimPO and LimPO ($P < 0.05$).

Key words: *in vitro* maturation rate, metaphase II, SimPO, LimPO

PENDAHULUAN

Program *crossbreeding* dilakukan untuk meningkatkan kemampuan genetika sapi lokal yang rendah dengan memunculkan sifat heterosis yang menguntungkan pada keturunannya (Gosey, 2005). Sapi Simmental Peranakan Ongole (SimPO) dan Limousin Peranakan Ongole (LimPO) merupakan salah satu hasil program *crossbreeding* di Indonesia (Hardjosubronto, 1994). Berdasarkan pengamatan di lapangan bahwa tidak semua SimPO dan LimPO mencapai tingkat heterosis yang tinggi, terjadi penurunan kinerja reproduksi pada fenotipe 2 (F2) seperti rendahnya tingkat kebuntingan dan panjang estrus melebihi 24 jam.

Keberhasilan kebuntingan melewati beberapa proses mulai maturasi oosit, ferilisasi dan pembelahan embrio. Maturasi *in vitro* selain merupakan bagian dari *assisted reproduction technology* (ART) merupakan teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah infertilitas (Karja *et al.*, 2010). Keberhasilan maturasi oosit *in vitro* sampai mencapai metafase II menjadi syarat untuk keberhasilan ferilisasi dan kebuntingan. Kemampuan oosit untuk melanjutkan

meiosis sampai metafase II disebabkan oleh faktor intrinsik seperti genetika yang diturunkan oleh tetuanya akibat perkawinan yang menyebabkan gen homozigotnya bertambah atau gen resesifnya terekspresi (Yang *et al.*, 1998). Maturasi oosit juga dipengaruhi oleh genotipe ternak, persilangan antar *strain* yang berbeda menyebabkan adanya variasi genetika dalam pola meiosis secara *in vitro* (Cheng *et al.*, 2012). Penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat maturasi sapi *crossbred* SimPO dan LimPO.

MATERI DAN METODE

Koleksi Oosit

Oosit berasal dari ovarium sapi yang diambil dari rumah potong hewan (RPH). Segera sesudah sapi disembelih dikelompokkan berdasarkan jenis sapi yakni PO (kontrol), SimPO, dan LimPO. 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 pemotongan. Koleksi oosit dilakukan dengan 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 larutan *dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS, Embryotek, Nippon Zenyaku, Fukushima, Japan) (Invitrogen Corp) yang disuplementasi dengan *bovine serum albumin* (BSA, Sigma St. Louis, MO, USA) dan gentamisin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Oosit yang digunakan adalah oosit yang dilapisi oleh sel-sel kumulus atau hanya dikelilingi lebih dari 2 lapis sel kumulus dengan ooplasma yang homogen. Oosit hasil koleksi dicuci dengan medium koleksi dan medium maturasi masing-masing sebanyak dua kali.

Maturasi Oosit *In Vitro*

Oosit dimaturasi dalam medium *tissue culture medium* (TCM 199) yang disuplementasi dengan *fetal bovine serum* (FBS) 5%, *follicle stimulating hormone* (FSH) 0,02 IU/ml (Sigma St. Louis, MO, USA), taurina 0,05 g (Sigma St. Louis, MO, USA), dan gentamisin 50 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). Oosit dimaturasi dengan cara memindahkan oosit dalam *polystyrene culture dish* (35x10) yang berisi medium maturasi dalam bentuk tetesan (drop) masing-masing berisi 100 µl untuk 10-15 oosit dan ditutupi dengan minyak mineral (Sigma St. Louis, MO, USA), diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, kelembaban 95%, pada suhu 38,5° C selama 24 jam (Budiyanto *et al.*, 2006).

Fiksasi dan Pewarnaan Oosit

Tingkat maturasi oosit ditentukan dengan metode pewarnaan *aceto orcein* 1% seperti yang digambarkan oleh Budiyanto *et al.* (2006) dan Karja *et al.* (2010), pada akhir waktu maturasi sebelum dilakukan evaluasi. Oosit yang telah dimaturasi dilepaskan dari sel-sel kumulus yang mengelilinginya dengan menggunakan hialuronidase (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) 0,1% dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet Pasteur yang berdiameter sesuai dengan ukuran oosit. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus diletakkan pada gelas obyek, ditutup dengan *cover glass* yang diberi bantalan parafin dan vaselin dengan perbandingan 1:9. Obyek gelas yang berisi oosit difiksasi, media fiksasi berupa etanol dan asam asetat dengan perbandingan 3:1 selama 3-4 hari pada temperatur kamar. Preparat diwarnai dengan *aceto orcein* 1% dalam 45% asam asetat selama 5 menit kemudian dicuci dengan media *restaining* dan dievaluasi menggunakan mikroskop fase kontras. Status maturasi oosit ditentukan berdasarkan perubahan-perubahan konfigurasi kromosom dan membran nukleus yang terjadi yaitu *germinal vesicle* (GV) ditandai adanya membrane inti dan nukleus terlihat jelas di tepi. *Germinal vesicle break down* (GVBD) ditandai robeknya membran inti sehingga nukleus tidak terlihat jelas; metafase I (MI) ditandai adanya kromosom homolog yang berpasangan dan berderet dibidang ekuator; anafase I (AI) ditandai sentromer menuju kedua kutub yang berlawanan dan kromosom homolog tertarik menjadi dua bagian;

telofase I ditandai kromosom homolog terkumpul secara sempurna pada masing-masing kutub; dan metafase II (MII) ditandai adanya *polar body* I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap metafase I.

Analisis Data

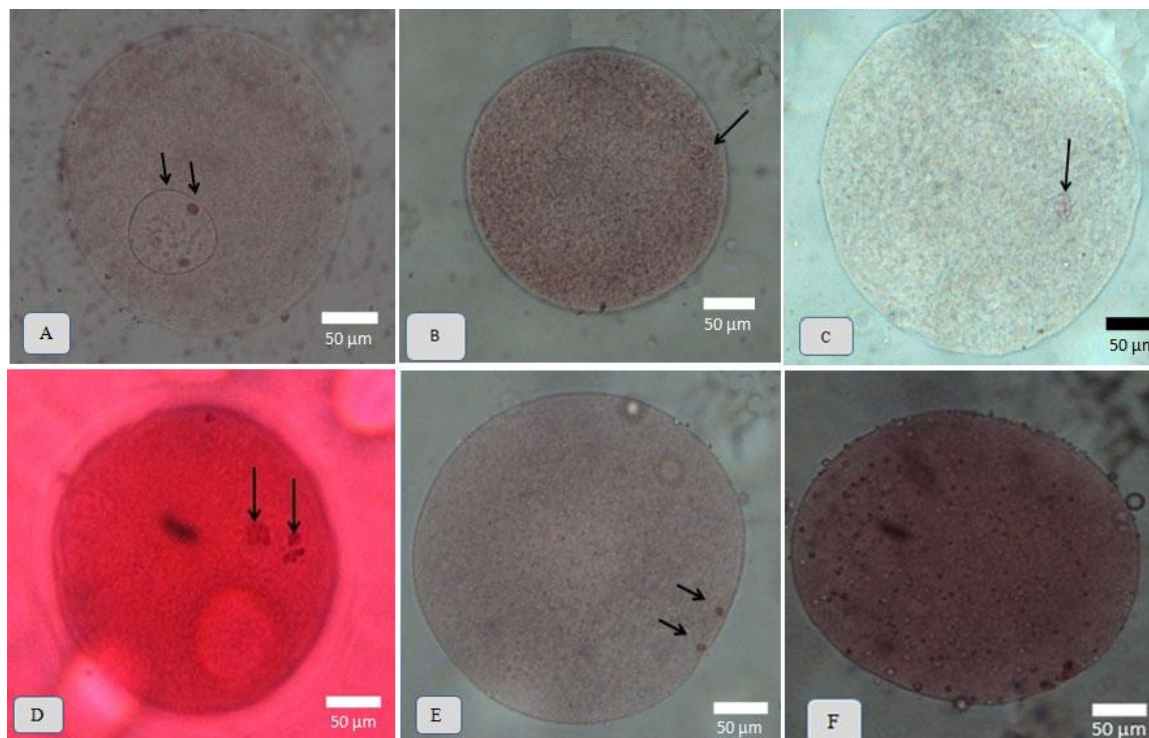
Persentase jumlah oosit yang mencapai fase maturasi, ditransformasi dalam bentuk *arcsin*. Data yang sudah ditransformasikan kemudian dianalisis dengan analisis varian (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil Fisher menggunakan Statview program (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maturasi oosit secara *in vitro* menghasilkan oosit sekunder haploid, yang memiliki komponen sel untuk keperluan keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio *in vitro*. Tahapan atau tingkat maturasi oosit melewati beberapa tahap sampai mencapai MII. Pada penelitian ini tingkat maturasi yang diamati dikelompokkan menjadi GV, GVBD, MI, anafase I/telofase I (AI/TI), dan MII dan disajikan pada Gambar 1.

Tingkat maturasi *in vitro* dari oosit sapi PO, SimPO dan LimPO disajikan pada Tabel 1. Hasil penelitian dari oosit sapi PO, SimPO, dan LimPO yang mencapai tingkat maturasi tahap MII dari oosit sapi PO terdapat perbedaan bermakna lebih tinggi dari sapi SimPO dan LimPO ($P < 0,05$), namun tidak ada perbedaan tingkat maturasi pada MII antara SimPO dan LimPO ($P > 0,05$). Hal ini diduga disebabkan adanya efek *crossbreeding* yang menurunkan sifat genetika heterosis yang dihasilkan. Berkurangnya sifat heterosis akibat silang balik antara sapi SimPO, LimPO dengan tetuanya. Menurut Cognie *et al.* (1998), kemampuan oosit melanjutkan proses meiosis juga dipengaruhi oleh genetika. Sapi-sapi hasil *crossbred* yang disilangkan dengan salah satu tetuanya dapat mengurangi pencapaian heterosis maksimal (Noor, 1996).

Boujenane *et al.* (1991) mengatakan, silang balik yang dilakukan pada *crossbred* menyebabkan meningkatnya perkawinan sedarah yang dapat menurunkan genetika heterosis sehingga terjadi perubahan pada homolog kromosom dan jumlah pasangan kromosom menjadi homozigot dan menyebabkan kinerja reproduksi rendah seperti kualitas oosit yang dihasilkan oleh sapi rendah. Penurunan kualitas genetika akibat berkurangnya heterosis dapat dilihat dari rendahnya kinerja reproduksi (Gregory *et al.*, 1992; Olson *et al.*, 1993). Bila heterosis berkurang maka gen homozigot bertambah dan perubahan tatanan gen yang terjadi menyebabkan mutasi gen yang bertanggung jawab terhadap genotipe keturunan, misalnya rendahnya reproduksi (Gregory *et al.*, 1992; Olson *et al.*, 1993; Gosey, 2005).



Gambar 1. Status inti oosit setelah maturasi *in vitro*. Tanda panah= Menunjukkan status inti pada tahap: A= *Germinal vesicle* (GV), B= *Germinal vesicle break down* (GVBD) C= Metafase I (MI) D= Anafase I/Telofase I (AI/TI), E= Metafase II (M II) dan F= Fragmentasi (F)

Tabel 1. Arcsin tingkat maturasi *in vitro* oosit sapi PO, SimPO, dan LimPO*

Jenis Sapi	Jumlah Oosit	Mean ± SEM (n) dari oosit pada stadium**					
		GV	GVBD	MI	AI/TI	MII	F
PO	42	11,9 ± 1,2(5)	4,8 ± 0,9(2)	11,9±1,7(5)	2,4± 0,9(1)	59,5±2,7(25) ^a	9,5±1,3(4) ^a
SimPO	43	13,9±1,9 (6)	6,9 ± 1,8(3)	6,9±1,8(3)	4,7±1,1(2)	46,5±2,5(20) ^b	21,0±2,3(9) ^b
LimPO	41	19,5± 2,1(8)	9,8 ± 1,9(4)	9,8±1,9(4)	2,4±1,1(1)	46,3±1,8(19) ^b	17,1±2,1(7) ^b

KESIMPULAN

Tingkat maturasi *in vitro* oosit sapi SimPO dan LimPO yang mencapai metafase II lebih rendah dibandingkan sapi PO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada RPH Yogyakarta yang telah bersedia memberikan ovarium sapi untuk penelitian ini dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Boujenane, I., G.E. Bradford, Y.M. Berger, and A. Chikhi. 1991. Genetic and environmental effects on growth to 1 year and viability of lambs from a crossbreeding study of d'man and sardi breeds. *J. Anim. Sci.* 69: 3989-3998.
 Budiyanto, A., T. Otoi, P. Wongsrikeao, M. Tanaguchi, R. Shimizu, H. Wantari, and T. Nagai. 2006. Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reproduct. Developm.* 52:123-127.

Cheng, Y., Z. Zhisheng, and E. Keith. 2012. Strain specific spontaneous activation during mouse oocyte maturation. *J. Fertil Steril.* 98(1):200-206.
 Cognie, Y., F. Benoit, N. Poulin, H. Khatir, and M.A. Driancour. 1998. Effect of follicle size and of the fec^b booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reproduct. Fertility.* 112:379-386.
 Gosey, J. 2005. Crossbreeding the Forgotten Tool in *Proceedings The Range Beef Cow Symposium XIX*. Animal Science Department University of Nebrask. Rapid City, South Dakota Lincoln:39- 48.
 Gregory, K.E., L.V. Cundiff, and R.M. Koch. 1992. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for reproduction and maternal traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70:656-672.
 Hardjosubronto, W. 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. PT. Gramedia Widiasarana Indonesia, Jakarta.
 Karja. K.N.W., W.P Aqshani, P.K. Yesi, G.P. Veronika, dan S. Gustari. 2010. Fetal bovine serum meningkatkan maturasi inti oosit kelinci setelah dimaturasi secara *in vitro*. *J. Vet.* 11(3):173-178.
 Noor, R.R. 1996. *Genetik Ternak*. Penebar Swadaya, Jakarta.
 Olson, T.A., F.M. Peacock, and M. Koger. 1993. Reproductive and maternal performance of rotational three-breed, and inter se crossbred cows in Florida. *J. Anim. Sci.* 71:2322-2329.
 Yang, X., C. Kubota, H. Suzuki, P.E.J Bols, and G.A. Presiccei. 1998. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology.* 94:471-483.