

**SUPLEMENTASI HORMON GONADOTROPIN PADA MEDIUM MATURASI *IN VITRO*
UNTUK MENINGKATKAN PERKEMBANGAN EMBRIO STADIUM 4 SEL KAMBING
BLIGON**

**SUPPLEMENTATION OF GONADOTROPIN HORMONE INTO *IN VITRO* MATURATION
MEDIUM TO INCREASE 4 CELL STADIUM EMBRYO DEVELOPMENT OF BLIGON GOAT**

Dewi Pranatasari*, Kustono, dan Diah Tri Widayati
Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

Submitted: 14 August 2015, Accepted: 17 May 2016

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro* terhadap tingkat maturasi, fertilisasi dan perkembangan embrio kambing Bligon yang diproduksi secara *in vitro*. Tahapan penelitian meliputi koleksi oosit, maturasi *in vitro*, fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio *in vitro*. Pada tahap maturasi oosit yang telah dikoleksi dibedakan dalam dua kelompok berdasarkan medium maturasi, yaitu *tissue culture medium* (TCM) dengan suplementasi GnRH 0 IU/mL dan 25 IU/mL. Data morfologi oosit dan embrio dianalisis secara deskriptif. Data angka maturasi dan perkembangan embrio dianalisis dengan *independent sample t-test*. Data fertilisasi dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan persentase oosit *mature* untuk suplementasi GnRH 0 IU/mL dan GnRH 25 IU/mL berturut-turut adalah 54,10±25,97 dan 54,89±26,44%. Pada oosit *mature* tampak ekspansi sel kumulus yang merenggang dan mengelilingi oosit. Perkembangan embrio *in vitro* stadium 2 sel dengan suplementasi GnRH 0 IU/mL dan GnRH 25 IU/mL berturut-turut adalah 13,02±11,09 dan 27,01±16,65%, sedangkan untuk stadium 4 sel masing-masing sebesar 10,16±10,01 dan 16,67±14,91%. Embrio yang dihasilkan pada suplementasi gonadotropin menunjukkan ukuran blastomer seragam, blastomer intak, warna blastomer terang, dan bentuk embrio bundar *spherical*. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro* tidak meningkatkan angka maturasi oosit dan perkembangan embrio 4 sel, tetapi dapat meningkatkan angka perkembangan embrio 2 sel kambing Bligon. Suplementasi hormon dapat meningkatkan kualitas maturasi dan kualitas embrio.

(Kata kunci: Fertilisasi *in vitro*, Hormon gonadotropin, Kambing Bligon, Perkembangan embrio)

ABSTRACT

The study was carried out to investigate the effect of gonadotropin hormone supplementation into in vitro maturation medium on maturation, fertilization and embryo development of Bligon goats. This research steps consist of oocyte collection, in vitro maturation, in vitro fertilization, and in vitro embryo development. At the maturation stage the oocyte that had been collected and divided into two groups based on the maturation medium, that was tissue culture medium (TCM) with supplementation of GnRH 0 IU/mL and GnRH 25 IU/mL. Oocyte and embryo morphology data were analyzed descriptively. Maturation rate and embryo development data were analyzed by using independent sample t-test. Fertilization data was analyzed descriptively. The result showed the percentages of mature oocytes from gonadotropin supplementation of 0 IU/mL and 25 IU/mL were 54.10±25.97 and 54.89±26.44%, respectively. Expansion cumulus cells surrounding the oocytes might indicated the mature oocytes. Cleavage rate of the 2 cells stage were 13.02±11.09 and 27.01±16.65%; respectively, and for the 4 cells stage were 10.16±10.01% and 16.67±14.91%. Embryos obtained from the treatment, indicated uniform of blastomeres in the size, tight, compact, intact, and round-spherical shape. It could be concluded that supplementation of gonadotropin hormone into in vitro maturation medium could not increase the rate of oocyte maturation and 4 cell embryo development, but it could increase 2 cell embryo development of Bligon goats. Hormone supplementation could improved the maturation and embryo quality.

(Key words: Bligon goats, Embryo development, Gonadotropin hormone, In vitro fertilization)

* Korespondensi (corresponding author):
Telp. +62 812 6303 7054
E-mail: pranatasaridewi@gmail.com

Pendahuluan

Ternak kambing menduduki peranan penting dalam sistem pertanian di Indonesia, hal ini tercermin dari data statistik yang menunjukkan bahwa pada tahun 2009 populasi kambing di Indonesia sebanyak 15.815.317 ekor (Kementrian Pertanian, 2009). Populasi tersebut terdiri dari beberapa bangsa kambing lokal diantaranya kambing Kacang, kambing Peranakan Etawah dan kambing Bligon. Kambing Bligon merupakan kambing silangan dari kambing Peranakan Etawah (PE) dengan kambing lokal (kambing Kacang), tetapi bentuknya lebih mirip kearah kambing Kacang (Basuki et al., 1982). Presentase darah kambing Kacang lebih tinggi yaitu lebih dari 50% dibanding dengan kambing PE (Sarwono, 2012). Perbedaan berat badan kambing PE dan kambing Bligon yakni kambing PE dewasa mempunyai bobot badan sekitar 32-37 kg, sedangkan kambing Bligon dewasa sekitar 20-30 kg dengan tanda-tanda karakteristik tubuh sebagai berikut: telinga agak terkulai, profil muka agak cembung, terdapat sedikit jumbai (bulu kasar panjang), tubuh padat dan produksi daging tinggi (Budisatria et al., 2009). Berdasarkan bobot badan yang dapat dicapai oleh kambing Bligon maka kambing ini cocok sebagai penghasil daging.

Perkembangan teknologi reproduksi seperti bioteknologi reproduksi yakni inseminasi buatan, sinkronisasi estrus, super ovulasi, *in vitro maturation* (IVM), *in vitro fertilization* (IVF), *in vitro culture* (IVC), transfer embrio (TE), dan kloning, diharapkan mampu meningkatkan produksi dan produktivitas kambing Bligon dan dapat membantu mengatasi masalah efisiensi reproduksi.

Fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang dapat dipakai untuk memproduksi embrio dengan memanfaatkan ovarium yang berasal dari rumah pematangan hewan (RPH) (Wattimena, 2011). Hasil samping RPH dari pematangan kambing Bligon salah satunya adalah ovarium yang bermanfaat sebagai sumber oosit yang murah dan mudah diperoleh. Proses fertilisasi *in vitro* meliputi pengambilan oosit dari folikel ovarium, maturasi oosit, kapasitas *spermatozoa*, fertilisasi *in vitro*, dan kultur oosit yang sudah difertilisasi untuk menjadi embrio (Boediono et al., 2000). Oosit yang diperoleh dari koleksi

oosit ovarium mempunyai stadium yang berbeda-beda, sehingga perlu dimaturasi untuk menghasilkan oosit yang siap difertilisasi. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan keberhasilan maturasi dan fertilisasi *in vitro* adalah dengan penambahan hormon pada medium maturasi.

Hormon berpartisipasi dalam proses reproduksi alami. Partisipasi ini mungkin melalui kerja langsung hormon terhadap suatu aspek khusus reproduksi atau melalui kerja tidak langsung hormon terhadap kelangsungan fisiologis lingkungan internal yang menjamin keberhasilan reproduksi (Adifa et al., 2010). Hormon-hormon reproduksi memegang peranan penting dalam aktivitas reproduksi ternak. Salah satu hormon reproduksi adalah gonadotropin.

Gonadotropin merupakan hormon yang disekresikan oleh *adenohypofise* dari kelenjar *anterior pituitary*. Gonadotropin terdiri dari *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). *Follicle stimulating hormone* bersama dengan *growth factor* dapat merangsang sel-sel kumulus untuk memproduksi dan mensekresikan asam *hyaluronic* yang akan mendispersikan sel yang mana proses ini disebut ekspansi atau *mucifikasi* (Ciptadi et al., 2011). *Follicle stimulating hormone* dalam medium maturasi akan menstimulasi dan mengatur kondensasi kromatin untuk proses pembelahan meiosis, selain itu FSH akan menstimulasi terjadinya peningkatan konsentrasi cAMP dan ekspansi sel-sel kumulus (Wattimena, 2011). *Luteinizing hormone* dapat melengkapi aksi FSH dalam merangsang perkembangan folikel, sel granulosa dan sel *theca* sehingga sekresi estrogen menjadi meningkat, yang akan turut merangsang maturasi oosit (Ciptadi et al., 2011). Adifa et al. (2010) menyatakan bahwa LH mempunyai fungsi merangsang maturasi folikel, merangsang ovulasi, dan membentuk korpus luteum dan fungsi selularnya adalah menaikkan steroidogenesis.

Proses maturasi *in vitro* ditandai dengan adanya ekspansi sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit. Hal ini berkaitan dengan fungsi sel kumulus dalam merespon rangsangan *endocrine* dan fungsi sebagai fasilitas untuk memproduksi zat-zat nutrisi yang dibawa ke oosit dan mengontrol serta mengatur metabolisme oosit yang pada gilirannya berperan dalam maturasi inti dan sitoplasma. Penambahan hormon FSH dan

LH pada medium menunjukkan adanya peningkatan terhadap tingkat maturasi oosit kambing dari segi ekspansi sel-sel kumulus sebesar 54% (Ciptadi *et al.*, 2011).

Proses fertilisasi meliputi penetrasi *spermatozoa* pada zona pelusida, dengan terkelupas dan hilangnya membran akrosom bagian luar yang bervesikula dan membran plasma pada permukaan zona. Penerobosan melalui zona sebagian disebabkan oleh aksi setempat dari akrosin yang berkaitan dengan membran, tetapi peningkatan motilitas akibat kapasitas tetap berperan penting dalam fase penetrasi. Langkah ini diikuti perlekatan *spermatozoa* pada membran plasma (vitelina) sel telur, berhentinya aktivitas flagela, penggabungan kepala *spermatozoa* ke dalam ooplasma melalui peleburan membran plasma, dekondensasi kromatin, dan pembentukan pronukleus jantan (Adifa *et al.*, 2010).

Oosit mengalami mitosis, setelah terjadi fertilisasi, sampai tahap 16 sel, dan dapat dihitung di bawah mikroskop. Embrio diberi nama sesuai dengan jumlah sel, yaitu 1, 2, 4, dan 8 sel embrio. Embrio 16 sel disebut morula, karena masa sel menyerupai sebuah *mulberry*. Perkembangan selanjutnya, morula menjadi kompak dan membentuk rongga blastosis, dan embrio disebut blastosis embrio (Tanaka, 2001), pada masing-masing pembelahan sel menjadi lebih kecil (Bearden dan Fuquay, 1997). Penambahan FSH dan estrogen pada media pematangan sangat berpengaruh pada perkembangan embrio. Hormon gonadotropin menginduksi pematangan sel kumulus, selanjutnya penambahan hormon dapat meningkatkan derajat fertilisasi dan perkembangan embrio sampai blastosis.

Penelitian tentang pengaruh suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro* untuk peningkatan tingkat maturasi, fertilisasi dan perkembangan embrio kambing Bligon *in vitro* belum banyak dilakukan, sehingga dilakukan penelitian ini.

Materi dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Materi penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 113 ovarium kambing Bligon yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kentungan yang berlokasi di Jl. Kaliurang KM. 7, Sleman, Yogyakarta.

Alat penelitian

Seperangkat alat penelitian yang digunakan adalah *Laminar Air Flow* (LAF) (Envair, Inggris), inkubator CO₂ (Cole Parmer, Amerika), mikroskop stereo (Cole Parmer, Amerika), *autoclave*, oven 50-250°C (Jouan, Prancis), *syringe* 3 mL jarum 22G (One Med, Indonesia), *disposable tissue culture dish* (TCD) (Falcon, Amerika Serikat), timbangan analitik (Sartorius, Jerman), gelas ukur 250 mL, optilab (Nikon, Jepang), kompor listrik, tabung erlenmeyer 250 mL, *thermos*, *stirer*, *micropipet*, *thermometer*, tabung *non-heparin microhematocrit* (Brand, Wertheim), tabung sentrifus, lampu spiritus, pinset, kikir, mikrofilm, spatula, *tissue*, *filter milipore*, *cutter*, gunting, *stereo desiccted microscope*, dan *disposable equipment* untuk *handling* embrio.

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan adalah *tissue culture medium* (TCM-199) (Gibco, USA) yang mengandung medium-199, *penicillin*, *streptomycin*, dan *bovine serum albumin* (BSA); *dulbeccos' phosphat buffered saline* (DPBS) (Gibco, USA); *fetal calf serum* (FCS), *mineral oil*, *penicilin* (Meiji, Indonesia), *streptomycin* (Meiji, Indonesia), *aquadest*, aluminium foil, alkohol 70%, gonadotropin (Fertagyle, Australia), *spermRinseTM-30* (Vitrolife, Sweden), *G-fertTM* (Vitrolife, Sweden), *G-1TM v3 PLUS* (Vitrolife, Sweden), dan *G-2TM v3 PLUS* (Vitrolife, Sweden).

Metode penelitian

Koleksi dan pencucian oosit.

Ovarium dikumpulkan dari rumah potong hewan (RPH) dalam keadaan segar setelah dipotong dan dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis dalam *thermos* dengan suhu 31 – 34°C (suhu optimal penyimpanan ovarium) (Widayati *et al.*, 2014). Oosit kemudian dibawa ke laboratorium dengan lama perjalanan 20 menit. Oosit dikoleksi dengan cara aspirasi. Oosit yang sudah dikoleksi dipindahkan ke TCD yang telah diisi DBPS secara perlahan untuk menghindari kerusakan oosit dan sel-sel kumulus.

Pengamatan oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo. Oosit hasil aspirasi diambil dari TCD penampungan menggunakan pipet aspirasi dan dicuci satu kali pada DPBS kemudian dicuci dua kali di TCM-199. Pencucian oosit dua sampai tiga kali bertujuan untuk membersihkan kotoran atau sel-sel yang ikut terambil tetapi tidak diperlukan dan dapat mengganggu proses maturasi oosit *in vitro*. Kotoran atau sel-sel tersebut dapat merusak medium maturasi, yaitu menurunkan pH medium yang netral menjadi lebih asam, sehingga medium tidak isotonik.

Maturasi oosit *in vitro*. Dipersiapkan dua *disposable* TCD untuk proses maturasi oosit *in vitro*. Dua TCD tersebut masing-masing diberi tanda GnRH 0 dan GnRH 25. *Disposable tissue culture dish* yang sudah diberi tanda diisi *drop* TCM-199 sebagai medium. *Mineral oil* dituangkan dalam TCD sehingga seluruh permukaan *drop* TCM-199 terendam, karena *mineral oil* berfungsi mencegah kontaminasi dan untuk memudahkan *handling* oosit. Media maturasi disimpan dalam inkubator minimal 1 jam sebelum penggunaan.

Oosit yang telah dicuci dengan DPBS dipindahkan dalam *drop* TCM-199 pada kedua TCD. Penempatan oosit sesuai dengan perlakuan yang diterimanya, yaitu: TCD bertanda GnRH 0 diisi dengan oosit yang mendapat perlakuan tanpa penambahan hormon gonadotropin (tanpa penambahan hormon) sedangkan TCD bertanda GnRH 25 diisi dengan hormon gonadotropin 25 IU/mL. Pemasakan oosit dilakukan dengan membiakkan oosit dalam medium TCM-199 dalam inkubator pada suhu 39°C, kelembaban 95% dan kadar CO₂ 5% selama 22-24 jam.

Oosit yang telah diinkubasi selama 22-24 jam kemudian dievaluasi maturasinya dengan cara mengamati ekspansi sel-sel kumulusnya. Tingkat ekspansi sel kumulus diukur dari selisih jarak antara sel kumulus sebelum maturasi dan sesudah maturasi pada oosit yang sama dan daerah yang sama. Pengukuran jarak sel kumulus ini menggunakan optilab.

Fertilisasi *in vitro*. Fertilisasi *in vitro* terdiri dari kapasitas *spermatozoa* dan *coculture mature* oosit. Medium dasar yang digunakan adalah *spermRinse*TM-30. *Spermatozoa* yang digunakan pada kapasitas adalah *spermatozoa* beku dalam

bentuk *straw* kambing PE dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari. Kapasitas *spermatozoa* dilakukan dengan cara *thawing* semen pada suhu 38°C lalu dimasukkan dalam *centrifuge tube*, dicuci dua kali dengan medium pencuci semen yaitu *spermRinse*TM-30. *Spermatozoa* dicuci dengan cara di *sentrifuge* sebanyak dua kali masing-masing selama 10 menit kemudian supernatan dibuang dan endapannya dicampur dengan medium fertilisasi (G-fertTM). *Spermatozoa* yang sudah dicampur dengan medium fertilisasi, kemudian dimasukkan ke TCD dan dituang mineral oil sampai seluruh permukaan *drop spermatozoa* tertutup. *Spermatozoa* tersebut diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5% dengan suhu 39°C selama 3 jam untuk kapasitas. Oosit yang sudah *mature* dicuci dalam TCM-199 sebanyak tiga kali sesaat sebelum dilakukan fertilisasi. Oosit kemudian dipindahkan ke dalam *drop spermatozoa* dan diinkubasi selama 5 jam dalam inkubator CO₂ 5%, 39°C.

Kultur embrio. Oosit yang telah difertilisasi selanjutnya dicuci dengan TCM-199 sebanyak tiga kali, lalu dimasukkan ke dalam *drop kultur* (G-1TM v3 PLUS) dan dimasukkan di dalam inkubator CO₂. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan setelah 24 jam dan jika ada yang membelah maka setelah inkubasi 48 jam dipindah dalam medium kultur G-2TM v3 PLUS.

Analisis data. Data morfologi oosit dan embrio dianalisis secara deskriptif. Data angka maturasi dan perkembangan embrio dianalisis dengan *independent sample t-test*. Data fertilisasi dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Maturasi oosit *in vitro*

Hasil persentase maturasi oosit *in vitro* disajikan pada Tabel 1. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada prosentase oosit *mature* antara medium dengan penambahan GnRH 25 dan GnRH 0 (tanpa penambahan hormon). Pada penelitian ini oosit yang digunakan diaspirasi dari folikel berdiameter antara 2-6 mm. Folikel dengan diameter 2 mm mengandung oosit yang sudah mengalami pertumbuhan secara penuh (telah mencapai stadium akhir profase meiosis pertama), sehingga apabila dimaturasi secara *in vitro* dapat melakukan pembelahan meiosis secara spontan. Oosit

Tabel 1. Persentase oosit *mature* dengan suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro*
(percentage of oocytes mature with gonadotropin hormone supplementation into *in vitro* maturation medium)

Suplementasi hormon (hormone supplementation)	Jumlah oosit yang teraspirasi (buah) (the number of oocytes aspirated (pieces))	Oosit <i>mature</i> , 24 jam (%) (mature oocytes, 24 hours (%))*
GnRH 0	58	54,10±25,97
GnRH 25	55	54,89±26,44

* Jumlah oosit *mature* (24 jam) digunakan untuk dasar perhitungan persentase pembelahan 2 sel dan 4 sel (total number of mature (24 hours) used for basic calculation of 2-cells and 4-cells cleavage percentage).

kambing yang berasal dari folikel dengan diameter kurang dari 1,6 mm belum menyelesaikan fase pertumbuhannya, sehingga belum mampu melakukan pembelahan meiosis pertama (Leidfried Rutledge *et al.*, 1987 *cit.* Kusindarta, 2009), sedangkan oosit pada folikel berdiameter 6 mm belum mengalami atresia (Gordon, 1994).

Evaluasi dari proses maturasi *in vitro* dilakukan dengan cara mengamati ekspansi sel-sel kumulus yaitu dengan mengukur sel-sel kumulus sebelum dan sesudah maturasi yang dapat ditunjukkan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat terdapat selisih ukuran sel kumulus sebelum dan sesudah maturasi pada GnRH 0 dan GnRH 25. Selisih ukuran tersebut dapat digambarkan dengan adanya ekspansi sel-sel kumulus. Ciri-ciri oosit *mature* paling mudah diamati adalah adanya ekspansi sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dan zona pelusida terlihat jelas. Gordon (1994) menyatakan bahwa evaluasi proses maturasi yaitu tingkat maturasi nukleus, ekspansi sel kumulus, dan penilaian morfologi dan metode pengecatan. Oosit yang telah dimaturasi secara *in vitro*, sel-sel yang mengelilingi oosit menyebar dan terjadi perubahan pada ruang perivitelin yaitu adanya *polar body* I (PB I) dan pembentukan metafase II (M II) blastomer pada permukaan vitelin. Sesuai dengan Linn *et al.* (2003) *cit.* Widayati (2008), maturasi yang baik adalah ekspansi kumulus, korona radiata terlihat bersinar, zona pelusida jelas,

ooplasma bersih, kumpulan membran sel granulosa ekspansi dengan bagus.

Veeck (1988) *cit.* Balaban dan Urman (2006) menyatakan bahwa sebuah kualitas yang baik dari oosit metafase II adalah oosit bersih, granular sitoplasma sedang, ruang perivitelin sempit, dan warna zona pelusida yang jelas. Maturasi oosit terdiri dari dua proses yang berbeda yaitu maturasi nukleus dan sitoplasma, keduanya akan berkoordinasi dengan baik untuk menjamin kualitas oosit. Bahkan oosit yang sudah mengalami maturasi nukleus, oosit masih terdapat kemungkinan terjadi defisiensi maturasi sitoplasma. Semua proses itu menyiapkan oosit untuk aktivasi, kemampuan fertilisasi, dan kemampuan untuk berkembang lebih lanjut (Ebner *et al.*, 2006).

Pada penelitian Widayati (1999) dibuktikan bahwa penambahan sel-sel kumulus pada medium maturasi tidak berpengaruh terhadap kemampuan maturasi oosit sapi *in vitro*, tetapi dapat meningkatkan daya fertilisasi dan pembeluhannya. Hasil penelitian yang dilakukan Ciptadi *et al.* (2011) menunjukkan bahwa perlakuan kontrol persentase maturasi yang dicapai termasuk rendah yaitu 20%, sedangkan penambahan hormon FSH dan LH pada medium mSOF menunjukkan peningkatan terhadap tingkat maturasi oosit kambing dari segi ekspansi sel-sel kumulus sebesar 54%. Penambahan FSH dan LH pada medium maturasi dapat meningkatkan ekspansi sel kumulus, akan

Tabel 2. Ukuran ekspansi sel-sel kumulus
(size of cumulus cells expansion)

Perlakuan (treatment)	Diameter sel-sel kumulus <i>immature</i> , 0 jam (μm) (diameter of <i>immature</i> cumulus cells, 0 hour (μm))	Diameter sel-sel kumulus <i>mature</i> , 24 jam (μm) (diameter of <i>immature</i> cumulus cells, 24 hour (μm))	Ekspansi sel-sel kumulus (μm) (cumulus cells expansion (μm))*
GnRH 0	3,33±0,66	4,47±0,57	1,14±0,08
GnRH 25	2,27±0,16	3,77±0,54	1,50±0,70

* Selisih antara diameter sel-sel kumulus *immature* dengan diameter sel-sel kumulus *mature* (the differences between the diameter of *immature* cumulus cells with the diameter of *mature* cumulus cells).

tetapi angka pembelahan dan perkembangan embrio tidak *significant*. Dosis maksimal penambahan hormon pada medium maturasi oosit sapi *in vitro* adalah 1 µg/mL FSH dan 1 µg/mL LH (Choi et al., 2001 cit. Adifa et al., 2010).

Kualitas oosit merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan maturasi oosit. Oosit dengan sel kumulus intak menyediakan faktor esensial selama proses maturasi, menjaga oosit dan berperan selama tahapan pembelahan meiosis serta mendukung maturasi sitoplasma. Maturasi oosit yang tidak bagus seperti kurangnya sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit akan menyebabkan penurunan metabolisme antara oosit dan sel-sel kumulus yang mengakibatkan tidak tersedianya nutrisi yang sangat dibutuhkan selama proses maturasi (Daoed et al., 2013).

Fertilisasi *in vitro*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil fertilisasi teridentifikasi dengan adanya perkembangan embrio 2 sel. Proses fertilisasi *in vitro* pada penelitian ini terjadi pada saat oosit diinkubasi dalam suspensi *spermatozoa*. *Spermatozoa* akan bergerak menuju kumulus oosit kompleks. Widayati et al. (2007) menyatakan bahwa fertilisasi pada mamalia meliputi 3 tahapan yang kritis yaitu (1) migrasi *spermatozoa* diantara sel-sel kumulus, (2) perlekatan dan migrasi *spermatozoa* menembus zona pelusida, dan (3) fusi membran plasma ovum dan *spermatozoa*. *Spermatozoa* dapat menembus sel-sel kumulus karena gerakan *spermatozoa* itu sendiri dan dibantu oleh enzim *hyaluronidase* yang terdapat pada akrosomanya.

Hunter (1981) cit. Adifa et al. (2010) menyatakan bahwa sumber, kondisi, motilitas, dan konsentrasi suspensi *spermatozoa* dapat mempengaruhi IVF. Dalam penelitian ini, *spermatozoa* yang

digunakan berkualitas baik dan dapat hidup dalam medium kurang lebih selama 48 jam, sehingga tidak mempengaruhi fertilisasi. Masa hidup *spermatozoa* kambing/domba dalam alat reproduksi betina adalah 30-48 jam, sedangkan masa hidup oosit adalah 16-24 jam (Hafez dan Hafez, 2000).

Perkembangan embrio *in vitro*

Perkembangan embrio *in vitro* dengan penambahan hormon gonadotropin pada medium maturasi dapat ditunjukkan pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil penelitian, persentase perkembangan embrio *in vitro* 2 sel GnRH 25 menunjukkan berbeda nyata dengan GnRH 0 (tanpa penambahan hormon), sedangkan persentase perkembangan embrio *in vitro* 4 sel GnRH 25 menunjukkan tidak berbeda nyata dengan GnRH 0. Perkembangan embrio 2 sel berbeda nyata dikarenakan pada penelitian ini hasil maturasinya hanya dilihat dari segi ekspansi sel-sel kumulus dan tidak dilihat dari tahapan maturasi. Perkembangan embrio *in vitro* sangat dipengaruhi oleh hasil maturasi *in vitro*. Oosit yang tidak mencapai tahap matang atau *metaphase II* dapat terhenti pada berbagai tahap sebelumnya seperti *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase I*, *anaphase* dan *telophase I* (Karja et al., 2002). Hormon gonadotropin menginduksi pematangan sel kumulus, selanjutnya penambahan hormon dapat meningkatkan derajat fertilisasi dan perkembangan embrio sampai blastosis. Sel kumulus sangat penting fungsinya untuk pematangan *cytoplasmic* secara normal pada proses maturasi sel telur *in vitro* (Triwulaningsih et al., 2001). Hasil penelitian produksi embrio blastosis pada kambing sekitar 11% (Boediono et al., 2000). Terdapat beberapa faktor yang saling mendukung untuk proses maturasi *in vitro*, antara lain

Tabel 3. Persentase pembelahan 2 sel dan 4 sel oosit kambing Bligon dengan suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro* (*cleavage percentage of 2-cells and 4-cells of Bligon goat oocytes with gonadotropin hormone supplementation into in vitro maturation medium*)

Kelompok hormon (<i>hormone group</i>)	Persentase oosit pembelahan 2 sel (%) (<i>percentage of oocytes in 2-cells cleavage (%)</i>)	Persentase oosit pembelahan 4 sel (%) (<i>percentage of oocytes in 4-cells cleavage (%)</i>)
GnRH 0	13,02±11,09	10,16±10,01
GnRH 25	27,01±16,65	16,67±14,91

adalah media maturasi *in vitro* (Hammam *et al.*, 2010), resiko kontaminasi dan kondisi kultur (Sagirkaya *et al.*, 2007). Medium yang digunakan pada penelitian adalah G-1™ (Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). G-1™ adalah medium basal yang dibuat untuk membantu perkembangan dan pembelahan sel embrio pada tahap 8 sel. G-1™ mengandung karbohidrat, asam amino, dan *chelators* pada awal embrio (Adifa *et al.*, 2010).

Pada perkembangan embrio 4 sel hasil analisis statistik menunjukkan tidak berbeda nyata, hal ini disebabkan oleh kualitas embrio dimana embrio yang dihasilkan kualitasnya tidak bagus sehingga menyebabkan banyak embrio yang degenerasi. Klasifikasi kualitas embrio berdasarkan morfologis adalah: Kualitas embrio A (*excellent*), stadium embrio sesuai dengan yang diinginkan (morula, blastosis dini atau blastosis), tidak cacat, bentuk bundar *spherical*, ikatan blastomer erat dan kompak, bentuk simetris, dan warna agak cerah; kualitas embrio B (*good*), stadium perkembangan 16-32 sel, tampak sedikit cacat seperti keluarnya salah satu blastomer dari ikatan, dan bentuk asimetris; kualitas embrio C (*fair*), stadium perkembangan agak terlambat satu sampai dua hari dari stadium yang diinginkan (8 – 16 sel), cacat, beberapa blastomer keluar, dan ukuran blastomer tidak sama besar atau asimetris; kualitas embrio D (*poor*) dan E (*very poor*) tidak layak ditransfer, embrio mengalami hambatan perkembangan parah (2-8 sel), embrio mengalami degenerasi seluler, ikatan-ikatan blastomer longgar sampai lepas atau ova yang tidak terbuahi (*unfertilized ova*). Embrio yang kualitas A dan B yang dipilih untuk transfer embrio (D'Alessandro dan Giovanni, 2003). Embrio yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah grade C untuk perlakuan GnRH 0 dan grade B pada perlakuan GnRH 25.

Evaluasi perkembangan embrio meliputi: 1). Kepadatan dari sel, embrio normal lebih padat dibandingkan kehilangan masa sel; 2). Regularitas bentuk, bentuk seperti bola lebih baik dibandingkan bentuk bulat lonjong; 3). Variasi dalam ukuran sel, ukuran blastomer yang sama; 4). Warna dan tekstur sitoplasma, harus bercahaya dan tidak terlalu gelap; 5). Adanya gelembung, pada sitoplasma seharusnya tidak mengandung gelembung bahkan yang berukuran kecil; 6). Adanya sel yang tertekan, seharusnya tidak mengandung sel yang tertekan; 7). Ukuran

embrio normal; 8). Regularitas zona pelusida; 9). Adanya reruntuhan dari sel, seharusnya tidak ada sedikitpun fragmentasi (reruntuhan) sel dari sekeliling blastomer; dan 10). Perkembangan sel yang sesuai dengan umur embrio (Bearden dan Fuquay, 1997).

Komponen-komponen yang diperlukan untuk perkembangan embrio tahap awal seperti protein dan faktor-faktor pertumbuhan. Protein tersebut akan dibebaskan pada saat embrio melewati oviduk, kemudian akan berikatan dengan zona pelusida dan masuk ke dalam sitoplasma embrio. Protein dan *messenger ribonucleic acid* (mRNA) yang terdapat pada embrio sangat penting untuk proses transkripsi yang terjadi pada stadium awal perkembangan embrio. Apabila terjadi kegagalan proses transkripsi, maka pembelahan embrio akan terhenti dan terjadi blokade (Gordon, 1994).

Kesimpulan

Suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi *in vitro* tidak meningkatkan angka maturasi oosit dan perkembangan embrio 4 sel, tetapi dapat meningkatkan angka perkembangan embrio 2 sel kambing Bligon. Suplementasi hormon dapat meningkatkan kualitas maturasi dan kualitas embrio.

Daftar pustaka

- Adifa, N. S., P. Astuti, dan T. D. Widayati. 2010. Pengaruh penambahan chorionic gonadotrophin pada medium maturasi terhadap kemampuan maturasi, fertilisasi, dan perkembangan embrio secara *in vitro* kambing peranakan etawa. Buletin Peternakan 34: 8-15.
- Balaban, B. and B. Urman. 2006. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod. Biomed. Online* 12: 59-66.
- Basuki, P., N. Ngadiyono, dan W. Hardjosubroto. 1982. Performans produksi dan reproduksi Kambing Peranakan Etawa (PE) dan Bligon. Pusat Penelitian dan Pengembangan Ternak, Departemen Pertanian, Bogor.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1997. *Applied Animal Reproduction*. 4th edn. Prentice Hall, New York.

- Boediono, A., Y. Rusianto, K. Mohamad, I. Djuwita, dan Herliatien. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Vet.* 7: 11-17.
- Budisatria, I. G. S., D. T. Widayati, B. Suhartanto, Kustantinah, H. Mulyadi, dan K. A. Santosa. 2009. Bangsa-Bangsa Kambing dan Sejarah Perkembangannya di Indonesia. Subbagian Plasma Nutfah Kambing di Indonesia. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ciptadi, G., T. Susilawati, B. Siswanto, dan H. N. Karima. 2011. Efektivitas penambahan hormon gonadotropin pada medium maturasi msf terhadap tingkat maturasi oosit. *J. Ternak Tropika.* 12: 108-115.
- Daoed, D. M., N. Ngadiono, D. T. Widayati. 2013. Pengaruh suplementasi *fetal calf serum* terhadap kemampuan maturasi *in vitro* oosit sapi. *Buletin Peternakan* 37: 136-142.
- D'Alessandro, G. A. and Giovanni, M. 2003. Use of purified FSH and LH for embryo production cryopreservation by conventional freezing or vitrification and transfer of embryos in dairy ewes. *Ital. J. Anim. Sci.* 2: 131-140.
- Ebner, T., M. Mozer, and G. Tews. 2006. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 12: 53-58.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos.* CAB International, UK.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. Micromanipulation of gametes and embryos: In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF/ET, In: *Reproduction in Farm Animals*, E. S. E Hafez 7th edn. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 443-465.
- Hammam, A. M., C. S. Whisnant, A. Elias, S. M. Zaabel, O. Hegab, and E. M. Abu-El Naga. 2010. Effect of media, sera and hormones on in vitro maturation and fertilization of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 27-31.
- Karja, N. W. K., T. Otoi, M. Murakami, M. Fahrudin, dan T. Suzuki. 2002. In vitro maturation, fertilization, and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stage of reproductive cycle. *Theriogenology.* 57: 2289-2298.
- Kementrian Pertanian. 2009. *Basis Data Statistik Pertanian (Hasil pencarian Berdasarkan Komoditi).* Tersedia pada <http://aplikasi.pertanian.go.id/bdsp/hasilKom.asp>. Diakses pada 19 Agustus, 2015.
- Kusindarta, D. L. 2009. Pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan ongole secara *in vitro*. *J. Kedokteran Hewan* 3: 185-193.
- Sagirkaya, H., M. Misirlioglu, A. Kaya, N. L. First, J. J. Parrish, and E. Memili. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Sarwono, B. 2012. *Beternak Kambing Unggul.* Penebar Swadaya, Depok.
- Tanaka, H. 2001. *Reproductive Biology and Biotechnology.* Japan International Cooperation Agency. Indonesia. 1-12.
- Triwulaningsih, E., M. R. Toelihere, J. J. Rutledge, T. L. Yusuf, B. Purwantara, dan Diwyanto. 2001. Produksi embrio in vitro dengan modifikasi waktu dan hormon gonadotropin selama pematangan oosit. *J. Ilmu Ternak dan Vet.* 6: 171-179.
- Wattimena, J. 2011. Pematangan oosit domba secara *in vitro* dalam berbagai jenis serum. *J. Agrinimal* 1: 22-27.
- Widayati, D. T. 1999. Pengaruh Penambahan Sel-Sel Kumulus pada Media terhadap Kemampuan Maturasi Oosit, Fertilisasi, dan Perkembangan Embrio Peranakan Ongole *In Vitro*. Tesis Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Widayati, D. T., Kustono, S. Bintara, W. Asmarawati, and Ismaya. 2007. *Gametogenesis dan Transport Gamet.* <http://elisa.ugm.ac.id/community/show/ilmu-reproduksi-ternak-fapet-oleh-diah-tri-widayati/>. Diakses tanggal 14 Desember 2014.
- Widayati, D. T. 2008. Effect of Oocyte Morphology on Embryo Development and Implantation. Materi Kuliah Program Konsultan Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi (*Unpublished*), bagian Obsgin. Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Widayati, D. T., D. H. Fatmawati, N. Ariesta, dan Kustono. 2014. Penggunaan cairan folikel dalam media maturasi *in vitro* Oosit Kambing Bligon. J. Kedokteran Hewan 8: 64-67.