

HUBUNGAN JUMLAH FOLIKEL PER OVARI DENGAN KUALITAS OOSIT DAN LAMA HARI TERBENTUKNYA BLASTOSIT FERTILISASI *IN VITRO* PADA SAPI *FRIES HOLLAND*

CECE SUMANTRI¹⁾ dan ANNEKE ANGGRAENI²⁾

¹⁾Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor
Jalan Rasamala, Darmaga Bogor, Indonesia

²⁾Balai Penelitian Ternak
PO. Box 221, Bogor 16002, Indonesia

ABSTRACT

CECE SUMANTRI and ANNEKE ANGGRAENI. 1999. The influence of follicle numbers per ovary on the quality of oocytes and the day length of forming blastocytes by in vitro fertilization. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4 (4): 215-219.

The aim of this research is to know the influence of the number of follicles produced per ovary on the quality of oocytes and the day length of developing blastocytes by in vitro fertilization (IVF) at 7-, 8-, and 9-days. Material of the research is ovary of *Fries Holland* dairy cattle gathered from slaughterhouse. A number of 138 ovaries are grouped into four based on the number of follicles per ovary, including group I (≤ 5 follicles), group II (6-10 follicles), group III (11-20 follicles), and group IV (≥ 20 follicles). The result showed that the number of follicles per ovary are not significantly ($P > 0.05$) influencing both on oocyte quality and the days length of forming blastocytes at 7-, 8-, and 9-days. Number of oocytes for grade A-B (percentage of the number of oocytes IVF per the number of oocytes obtained per ovary) for group I - IV consecutively is 83.5%, 91.3%, 97.1%, and 91.2%. The number of developing blastocytes (percentage the number of blastocytes per the number of oocytes) for group I - IV at 7-days consecutively is 5.19%, 5.56%, 5.45%, and 6.03%; at 8-days is 15.58%, 12.94 %, 13.64%, and 11.64%; at 9-days is 18.18%, 8.96%, 8.18%, and 10.35%.

Key words: Oocytes, IVF, blastocyte

ABSTRAK

CECE SUMANTRI dan ANNEKE ANGGRAENI. 1999. Hubungan jumlah folikel per ovary dengan kualitas oosit dan lama hari terbentuknya blastosit fertilisasi *in vitro* pada sapi *Fries Holland*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4 (4): 215-219.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh jumlah folikel yang dihasilkan oleh ovary terhadap kualitas oosit serta lama hari terbentuknya blastosit secara fertilisasi *in vitro* (FIV) pada hari ke-7, 8 dan 9. Materi penelitian mempergunakan ovary sapi *Fries Holland* (FH) yang dipanen dari rumah potong hewan. Sejumlah 138 ovary dikelompokkan ke dalam empat grup berdasarkan jumlah folikel per ovary meliputi grup I (≤ 5 folikel), grup II (6 - 10 folikel), grup III (11 - 20 folikel), dan grup IV (≥ 20 folikel). Hasil penelitian menunjukkan jumlah folikel per ovary tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) pada kualitas oosit yang dihasilkan dan juga tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) pada lama waktu terbentuknya blastosit pada hari ke-7, 8, dan 9. Banyaknya oosit *grade* A-B (persentase jumlah oosit FIV per jumlah oosit hasil panen per ovary) untuk grup I - IV didapatkan berurutan 83,5%, 91,3%, 97,1%, dan 91,2%. Banyaknya blastosit yang berkembang (persentase jumlah blastosit per jumlah oosit FIV) grup I -IV pada hari yang ke-7 berurutan 5,19%, 5,56%, 5,45%, dan 6,03%; pada hari ke-8 berurutan 15,58%, 12,94%, 13,64%, dan 11,64%; sedangkan pada hari yang ke-9 berurutan 18,18%, 8,96 %, 8,18%, dan 10,35%.

Kata kunci: Oosit, FIV, blastosit

PENDAHULUAN

Perkembangan embrio secara *in vitro* akan dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Pada faktor genetik terutama akan dipengaruhi oleh induk (SHIRE dan WHITTEN, 1980a) dan pejantan (SHIRE dan WHITTEN, 1980b; EID *et al.*, 1994; dan SUMANTRI *et al.*, 1998). Sementara itu, untuk faktor lingkungan antara lain meliputi umur dan diameter oosit (ARLOTTO *et*

al., 1992), teknik aspirasi (TAKAGI *et al.*, 1992) medium maturasi (FUNAHASHI dan DAY, 1993), fertilisasi *in vitro* (NIWA dan OHGODA, 1988; FUKUI *et al.*, 1990) dan kultuc embrio dengan menggunakan ko-kultur (FUKUI dan ONO, 1989; dan BAVISTER, 1993).

Terdapat korelasi positif antara diameter folikel dengan perkembangan embrio sebagaimana dilaporkan dari beberapa hasil penelitian (ARLOTTO *et al.*, 1996; TAKAGI *et al.*, 1992; ERICSON dan SORANSEN, 1974)

yang memperoleh lebih banyak perkembangan embrio tahap morula dan blastosit dengan semakin meningkatnya diameter folikel. Perbedaan hasil panen oosit antara individu sapi dilaporkan dapat pula memberikan pengaruh dalam menghasilkan blastosit yang dikembangkan secara *in vitro* (GOTO *et al.*, 1990; FUNAHASI *et al.*, 1991; dan MERMILLOD *et al.*, 1992). Meskipun demikian informasi tentang kapasitas perkembangan embrio secara *in vitro* dipandang dari kondisi individu ovarium masih memerlukan banyak perhatian.

Penelitian ini bertujuan untuk memeriksa perkembangan embrio secara *in vitro* berdasarkan aspek pertimbangan jumlah folikel dari setiap ovarium yang mungkin akan memberikan peranan penting pada perkembangan embrio sebelum rase implantasi pada sapi perah *Fries Holland*.

Penelitian ini dilakukan di Yamaguchi (Jepang) pada tahun 1997-1998.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian

Ovarium sapi FH dari rumah potong hewan dicuci dengan saline yang disuplementasi dengan campuran antibiotik (penicilin-G dan streptomisin) dan dimasukkan ke dalam termos dengan suhu 32°C. Oosit dari folikel berdiameter 2 sampai 5 mm dikelompokkan ke dalam empat grup berdasarkan jumlah folikel: grup I (<5); grup II (6-10); grup III (11-20) dan grup IV (>21). Oosit diaspirasi dengan menggunakan jarum suntik 18-G dan dicuci dengan medium PBS yang disuplementasi dengan 3% BSA.

Maturasi *in vitro*

Oosit kualitas baik (*grade* A dan B) dimaturasi *in vitro* dalam medium TCM-199 yang disuplementasi 5% serum sapi hasil superovulasi (MATSUOKA *et al.*, 1992), hormon FSH 0,01 mg/ml dan antibiotik gentamicin 50 mg/ml selama 22 jam pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator.

Fertilisasi *in vitro* (FIY)

Untuk menghindarkan pengaruh jantan (sperma), dipakai sperma yang berasal dari nomor *straw* yang sama. Semen beku dicuci dengan menggunakan medium 2,5 mM caffeine dalam BO medium (BRACKETT dan OLIPHANT, 1975) dengan cara mensentrifugasi .500 g selama 5 menit. Semen disuspensi dengan medium BO-caff yang disuplementasi dengan 1% BSA dan 20 mg/ml heparin. Konsentrasi sperma yang dipakai 5 x 10⁶/ml. Fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan cara mencampurkan 100 µl

suspensi sperma dengan 20-25 oosit selama 5 jam pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator.

Kultur

Embrio dikultur dalam medium TCM-199 yang disuplementasi 5% serum sapi hasil superovulasi/SC (MATSUOKA *et al.*, 1992), hormon insulin 0,01 mg/ml dan antibiotik gentamicin 50 mg/ml selama 8 hari pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator. Persentase *cleavage* (2, 4 dan 8 sel) dihitung dua hari setelah oosit difertilisasi (hari ke-0) dan persentase blastosis dihitung pada hari ke- 7, 8 dan 9. Pergantian kultur medium dilakukan setiap tiga hari sekali, dengan cara mengganti sebagian medium lama dengan medium baru, tanpa *merusak feed layer* kumulus sel sebagai ko-kultur.

Analisis statistik

Untuk mengetahui pengaruh jumlah folikel yang dihasilkan ovarium dari keempat grup yang ditetapkan (grup I - IV), dilakukan analisis ragam dengan menggunakan empat ulangan untuk setiap peubah persentase *cleavage* dan persentase blastosis yang didapatkan pada hari ke- 7, 8, dan 9. Dilakukan uji beda nilai tengah menggunakan *Duncan tets* pada hasil ragam yang memberikan pengaruh nyata (P<0,05).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan (Tabel 1) bahwasanya perbedaan jumlah folikel per ovarium memberikan pengaruh nyata (P<0,05) terhadap jumlah oosit dan jumlah blastosit yang dihasilkan. Akan tetapi perbedaan jumlah folikel per ovarium memberikan pengaruh tidak nyata (P>0,05) terhadap kualitas oosit, persentase *cleavage*, maupun persentase blastosit. Total jumlah oosit yang dihasilkan pada setiap grup berdasarkan jumlah folikel per ovarium memberikan hasil paling sedikit untuk grup I dan paling besar untuk grup IV. Hal ini ditunjukkan oleh rataan jumlah oosit yang semakin meningkat dengan semakin banyaknya jumlah folikel yakni pada grup I (folikel ≤5) dengan 2,89 ± 0,44 oosit, sedangkan tertinggi dicapai pada grup IV (folikel ≥ 21) dengan 22,13 ± 2,6 oosit.

Meskipun grup I menghasilkan rataan jumlah oosit per ovarium terendah, tetapi mempunyai persentase kualitas oosit *grade* A dan B (83,55 ± 7,34%), persentase *cleavage* (69,37:11,62%) dan persentase total blastosis (36,88 ± 5,87%). Hasil tersebut tidak berbeda nyata (P > 0,05) bila dibandingkan dengan grup I untuk kualitas oosit (91,19 ± 6,05%), *cleavage* (72,05 ± 8,69%), dan total blastosis (28,78 ± 9,23%). Dengan demikian diketahui bahwa oosit dari grup jumlah folikel per ovarium ≤5 mempunyai kapasitas untuk berkembang

yang sama dengan oosit dari grup dengan jumlah folikel ≥ 21 .

Ukuran dari folikel sangat berpengaruh terhadap kualitas oosit. Oosit yang berasal dari folikel berdiameter ≤ 2 mm mempunyai kemampuan tumbuh lebih rendah dari oosit yang berasal dari folikel berdiameter (2-6mm), sebaliknya oosit yang berasal dari folikel berdiameter >6 mm mempunyai kemampuan tumbuh yang nyata lebih tinggi. (TAN dan LU, 1990 dan LONERGAN *et al.*, 1991). Hal yang sama juga dilaporkan oleh ARLOTO *et al.* (1996) bahwa umur dan diameter oosit sangat berpengaruh mulai dari perkembangan dini sampai blastosis.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa persentase lama hari terbentuknya blastosis pada grup I dan grup IV tidak berbeda nyata ($P>0,05$), masing-masing pada hari ke-7 adalah $8,48 \pm 10,45\%$ dan $19,84 \pm 10,58\%$, pada hari ke-8 adalah $42,26 \pm 8,99\%$ dan $41,01 \pm 20,43\%$, serta pada hari ke-9 adalah $49,26 \pm 12,69\%$ dan $39,14 \pm 27,76\%$. Dengan demikian jumlah folikel per ovarium

tidak berpengaruh nyata terhadap lama hari terbentuknya blastosis. SUMANTRI *et al.* (1997) melaporkan bahwa lama terbentuknya blastosis pada sapi dipengaruhi oleh bangsa pejantan, dan pada manusia lama terbentuknya blastosis dipengaruhi oleh sperma Bapak (JANNY dan MENEZO, 1994). GOTO *et al.* (1990) yang melaporkan kemampuan menghasilkan oosit dari individu sapi sangat bervariasi dan berpengaruh terhadap pertumbuhan awal sampai blastosis. Hal senada juga dikemukakan MERMILLOD *et al.* (1992) dimana variasi individu dalam menghasilkan jumlah oosit dan pertumbuhan embrio sangat dipengaruhi oleh faktor genetik. GANDOLFI (1994) menyatakan bahwa pertumbuhan embrio dari zigot sampai blastosit pada mamalia, merupakan hasil interaksi antara program genetik pada kromosom dan lingkungannya pada kondisi *in vivo* (lingkungan pada saluran reproduksi induk) dan secara *in vitro* (tergantung pada kultur mediumnya).

Tabel 1. Hubungan jumlah folikel per ovarium dengan kualitas oosit, persentase *cleavage* dan persentase blastosis

Jumlah folikel/ ovarium	Jumlah ovarium	Jumlah oosit/ ovarium	Jumlah oosit <i>grade</i> A-B (%)	<i>Cleavage</i> 2-, 4- dan 8 sel (%)	Total blastosis (%)
≤ 5	46	133/46a (2,89 \pm 0,44)	111/133 (83,55 \pm 7,34)	77/133 (69,37 \pm 1,62)	30/77 (36,88 \pm 15,87)
6-10	47	305/47b (6,67 \pm 1,94)	277/305 (91,32 \pm 3,89)	201/277 (72,56 \pm 6,26)	54/201 (26,70 \pm 10,59)
11-20	30	373/30c (11,4 \pm 0,92)	325/373 (87,07 \pm 3,41)	220/325 (67,69 \pm 9,27)	60/220 (26,79 \pm 16,67)
≥ 21	16	354/16d (22,13 \pm 1,2,6)	322/354 (91,19 \pm 6,05)	232/322 (72,05 \pm 8,69)	65/232 (28,78 \pm 9,23)

Keterangan: Huruf berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($P<0,05$)

Tabel 2. Hubungan jumlah folikel per ovarium dengan lama hari terbentuknya blastosis

Jumlah folikel/ ovarium	Jumlah blastosis/ ovarium	Lama hari terbentuknya blastosis (%)		
		Hari ke-7	Hari ke-8	Hari ke-9
≤ 5	228/46a (0,64 \pm 0,41)	4/28 (8,48 \pm 10,45)	11/28 (8,48 \pm 10,45)	13/28 (49,26 \pm 12,69)
6-10	54/47b (1,18 \pm 0,58)	10/54 (19,22 \pm 17,24)	26/54 (41,86 \pm 22,96)	18/54 (38,91 \pm 34,19)
11-20	60/30b (1,84 \pm 0,65)	12/60 (24,06 \pm 17,48)	30/60 (46,25 \pm 14,93)	18/60 (29,67 \pm 5,98)
≥ 21	65/16c (4,06 \pm 0,97)	14/65 (19,84 \pm 10,58)	27/65 (41,01 \pm 20,43)	24/65 (39,14 \pm 27,76)

Keterangan: Huruf berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($P<0,05$)

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah folikel tidak memberikan pengaruh secara langsung mulai dari kualitas oosit sampai kepada lama terbentuknya blastosis. Ovarium dengan jumlah folikel yang tinggi memberikan gambaran status hormon FSH yang tinggi. Fungsi FSH adalah merangsang pertumbuhan folikel dalam ovarium, proses pematangan oosit dan perkembangan embrio secara dini, tetapi kurang berperan untuk perkembangan selanjutnya (EYESTONE dan BOER, 1993). Faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan embrio adalah hormon insulin. Insulin dapat meningkatkan transport gula dari medium langsung ke dalam blastosis (GARDNER dan KAYE, 1991). Pada penelitian ini digunakan insulin dengan dosis 0,01 mg/ml medium. Sehingga dapat diinformasikan perkembangan embrio secara *in vitro* bagi oosit pada grup I-IV mempunyai kondisi lingkungan *in vitro* yang seragam karena penelitian menggunakan media tumbuh yang sama.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwasanya banyaknya folikel yang dapat dipanen dari setiap ovarium tidak berpengaruh terhadap tingkat pertumbuhan dan perkembangan embrio *in vitro* sampai tahap blastosit dan lama terbentuknya blastosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Arlotto, T., M.L Leibfried-Rutledge, and N.L. First. 1992. Correlation of oocyte diameter with time of maturation in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 46 (Suppl.1), 66 abstr.
- Arlotto, T., J. L Schwartz, and N.L First. 1996. Aspect follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45 : 943-956.
- BAVISTER, B.D. 1993. Response to the use of co-culture for embryo development. *Human Reprod.* 7: 1339-1341.
- BRACKETT, B.G. dan G. OLIPHANT. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- EID, LN., S.P. LORTON, and J.J. LPARISH. 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51: 1232-1237.
- ERICSON, G.F. and R. A. SORANSEN. 1974. *In vitro* maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral Graafian follicle. *J. Exp Zool.* 190: 123-127.
- EYESTONE, W. H and H. A. BOER. 1993. FSH enhance developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology* 39:216.
- FUKUI, Y. and H. ONO. 1989. Effect of sera, hormones, and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage, and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 86 : 501-506.
- FUKUI, Y., T. SONOYAMA, H. .MOCHIZUKI, and H. ONO. 1990. Effect of heparine dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 34: 575-591.
- FUNASHI, H., Y. AOYAGI, T. TAKEDA, and T. ONIHARA. 1991. Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 36 : 427-434.
- FUNAHASHI, H., and B. N. DAY. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 39 : 965-973.
- GARDNER, H. G. and P.L KAYE. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod. Fertil. Develop.*36:313-316.
- GANDOLFI, F. 1994. Autocrine, paracrine, and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41:95-100.
- GOTO, K., Y. TAKUMA, and N. OOE. 1990. *In vitro* development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after fertilization. *Jpn J. Anim. Reprod.*36:110-113.
- LONERGAN, P., H. SHARIF, P. MONAGAN, H WAHID, M. GALLAGAER, and I. GORDON. 1991. The effect of follicle size on the type of bovine oosit obtained for *in vitro* maturation. Proceedings of Seventh Meeting of the European Embryo Transfer Association (Cambridge). 162.
- MATSUOKA, K. S. SAKATA, K. ICHINO, Y. SHIMAYA, and SUZUKI. 1992. Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 37: 254 abstr.
- MERMILLOD, P., C. WN.S, AMASSLP, and F.DESSY. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J. Reprod. Fertil.* 96 : 717-723.
- NIWA, K. and O. OHGODA. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparine on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733-741.
- SHIRE, J.G.M. and W. K WHITTEN. I 1980a. Genetic variation in the timing of first cleavage in mice: Effect of paternal genotype. *Biol. Reprod.* 23: 363-368.
- SHIRE, J. G .M. and W. K. WHITTEN. I 1980b. Genetic variation in the timing of first cleavage in mice: Effect of maternal genotype. *Biol. Reprod.* 23: 369-376.
- SUMANTRI, C., A. BOEDLQNO, M. OAE, S. SAHA, and T. SUZUKI. 1997. Fertility of sperm from a tetraparenUII chimeric bull. *Anim. Reprod. Sci.* 46:35-45.
- SUMANTRI, C., M. MURAKAMI, MD. VARISANGA, M. FAHRUDIN, dan T. SUZUKI. 1998. The relationship of the number of follicles present in an ovary and Developmental competence of bovine IVF embryo derived from individual cows. *Jpn. J.Fertil. Steril.* 43. (3): 165.169.

TAKAGI Y., K. MORI. and T. TAKHASI. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J. Anim. Sci.* 70: 1923.1927.

TAN. S.J. and KH. LU. 1990. Effects of different oestrous cycle stages of ovaries and sizes of follicles on generation of IVF early bovine embryos. *Theriogenblogy* 33:335.