

Perubahan Ukuran Folikel Ovarium dan Kualitas Oosit pada Ovarium Domba Lokal Pasca Preservasi dengan Waktu yang Berbeda. *(The Changes of Ovarian Follicles Size and Oocytes Quality from Local Sheeps' Ovarium after Preservation with Different Time)*

Nurul Ikhwan¹, Nurcholidah Solihati², Siti Darodjah Rasad², Rini Widyastuti²

Alumni Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran Tahun 2015¹

Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran²

e-mail: ikhwanspt@gmail.com

Abstract

Preservasi merupakan salah satu upaya penanganan ovarium untuk mempertahankan kualitas oosit yang telah diambil dari tubuh ternak agar dapat dimanfaatkan untuk Fertilisasi In Vitro. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu preservasi ovarium domba lokal terhadap ukuran folikel dan kualitas oosit. Sampel yang digunakan adalah ovarium domba lokal yang diperoleh dari tempat pemotongan hewan setempat. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental, dengan pemberian tiga perlakuan dan enam kali ulangan yaitu: P1= preservasi ovarium pada suhu 37°-38°C selama 2 jam, P2= preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 11-12 jam, dan P3= preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 24-25 jam. Hasil penelitian menunjukkan waktu preservasi ovarium memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap ukuran folikel kualitas oosit.

Kata kunci: domba lokal , folikel, oosit, preservasi

Abstract

Preservation is one of method for handling ovaries to maintain the quality of oocytes that had been taken from cattle that can be used for In Vitro Fertilization. The aims of this study is to determine the effect of a local sheep ovarian preservation to the follicle size and oocyte quality. The sample used is a local sheep ovaries were obtained from a local slaughterhouse. This research was conducted by using experimental methods with three treatment and six replications i.e: P 1= ovaries preservation temperature of 37°-38°C for 2 hours, P2= ovaries preservation in temperature 4°-5 ° C for 11-12 hours, and P3= ovaries preservation at a temperature of 4°-5 ° C for 24-25 hours. The results showed that the times of preservation have significantly different to the size of the follicle and oocyte quality.

Keyword: local sheeps, follicle, oocyte, preservation

Pendahuluan

Pemotongan domba tahun 2013 di Provinsi Jawa Barat telah mengalami peningkatan sebanyak 0,25% dibandingkan dengan tahun 2012 (Dinas Peternakan Jawa Barat, 2013). Upaya untuk memenuhi permintaan konsumsi daging domba bagi masyarakat diperlukan suatu cara agar jumlah populasi dan produksi ternak terus meningkat. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu melalui penerapan teknologi *In Vitro Fertilization* (IVF).

Teknologi IVF memerlukan ketersediaan gamet jantan maupun gamet betina. Salah satu sumber gamet betina yang cukup potensial adalah ovarium yang berasal dari Tempat Pemotongan Hewan (TPH). Pemanfaatan ovarium dari TPH merupakan cara yang

ekonomis, namun lokasi TPH yang jauh dengan laboratorium kemungkinan akan menyebabkan penurunan kualitas oosit pada saat transportasi ovarium dari TPH ke laboratorium.

Preservasi merupakan salah satu upaya penanganan ovarium agar dapat mempertahankan kualitas oosit selama transportasi. Salah satu perubahan yang terjadi pada ovarium selama proses preservasi adalah perubahan ukuran folikel dan kualitas oosit. Ukuran folikel dapat mengalami peningkatan maupun penyusutan ukurannya dan terjadi kerusakan sel yang diakibatkan oleh berhentinya suplai darah dan kekurangan oksigen (*hypoxia*). Salah satu upaya untuk meminimalisir efek tersebut adalah dengan pengaturan waktu dan

suhu dan media preservasi yang tepat selama proses preservasi.

Kualitas oosit dapat dipertahankan dengan mengatur waktu dan suhu yang tepat selama proses preservasi, sehingga cara tersebut dapat mendukung teknologi IVF. Sejauh ini preservasi ovarium telah dilakukan kambing (Silva *et al.*, 2003), anjing (Lopes, 2008) dan sapi (Ackay *et al.*, 2008, Widyastuti dan Rasad, 2015)

Namun demikian, penelitian tentang perubahan ukuran folikel dan kualitas oosit pada domba lokal pasca preservasi dengan berbagai waktu belum banyak dilakukan. Penelitian ini bermaksud untuk mengetahui pengaruh waktu preservasi ovarium terhadap perubahan ukuran folikel dan kualitas oosit domba lokal pasca preservasi. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah bagi para peneliti maupun akademisi sebelum melakukan penelitian IVF.

Materi dan Metode

Pengambilan Ovarium

Ovarium diambil dari domba lokal betina di TPH. Ovarium dibersihkan dengan media NaCl 0.9% yang telah ditambahkan dengan antibiotik *penicillin* 100 IU/ml dan *streptomycin* 0,1 mg/ml kemudian memasukan media beserta ovarium ke dalam wadah lalu wadah tersebut disimpan di dalam termos.

Preservasi Ovarium

Preservasi ovarium dilakukan di dalam termos dengan suhu 37°-38°C selama 2 jam dan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°-5°C selama 11-12 jam dan 24-25 jam.

Pengamatan Perubahan Ukuran Folikel Ovarium Pasca Preservasi

Folikel diukur menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan dua kali yaitu sebelum preservasi (awal) dan setelah preservasi (akhir). Folikel difoto dengan kamera yang berguna untuk identifikasi perubahan ukuran diameter.

Koleksi dan Evaluasi Oosit

Oosit dikoleksi dengan metode *slicing* menggunakan pisau dan pinset (Engcong dan Karja, 2013). Oosit yang telah dikoleksi, kemudian dievaluasi menjadi 4 kelompok kriteria kualitas yaitu A, B, C, dan D berdasarkan lapisan

sel kumulus dan gambaran sitoplasma (Gordon, 2003). Oosit yang dikelompokkan ke dalam:

1. Kualitas A jika oosit memiliki lima lapis atau lebih sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam.
2. Kualitas B adalah oosit yang memiliki kurang dari lima lapisan sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam.
3. Kualitas C adalah oosit yang terlihat masih sedikit lapisan sel kumulus, zona pellucida yang terlihat dan sitoplasma yang tidak homogen.
4. Kualitas D adalah oosit yang memiliki sitoplasma transparan, zona pellucida terlihat atau bahkan tidak ada sama sekali dan lapisan sel kumulus hampir hilang bahkan hilang seluruhnya.

Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali dengan 3 perlakuan preservasi ovarium yaitu P_1 = suhu 37°-38°C selama 2 jam (kontrol), P_2 = suhu 4°-5°C selama 11 - 12 jam, dan P_3 = suhu 4°-5°C selama 24 - 25 jam.

Diameter folikel yang dikelompokkan berdasarkan kriteria ukuran kemudian dihitung nilai perubahan diameter sebelum dan sesudah preservasi ovarium, kemudian analisis statistik menggunakan tabel analisis ragam (uji F). Oosit yang telah dikelompokkan berdasarkan nilai persentase kriteria kualitasnya kemudian tranformasi data ke dalam bentuk Akar Kuadrat untuk dilakukan analisis ragam (Gaspersz, 1995).

Hasil dan Pembahasan

Ukuran folikel dan kualitas oosit pasca preservasi menunjukkan hasil yang berbeda di setiap perlakuan. Hasil penelitian pada Tabel 1 mengenai pengaruh waktu preservasi ovarium terhadap diameter folikel domba lokal bahwa preservasi ovarium berdampak pada rata-rata perubahan diameter folikel yang mengakibatkan penyusutan ukuran. Rataan penyusutan diameter folikel yang tertinggi yaitu pada P_1 sebesar 0,217 mm, selanjutnya pada P_2 sebesar 0,168 mm, dan penyusutan terkecil pada P_3 sebesar 0,152 mm.

Tabel 1. Rataan Perubahan Diameter Folikel Setelah Preservasi Ovarium

Ulangan	Perlakuan		
			P3
	 mm		
1	0,230	0,194	0,151
2	0,188	0,188	0,118
3	0,194	0,148	0,181
4	0,186	0,175	0,179
5	0,222	0,101	0,151
6	0,280	0,199	0,131
Total	1,300	1,005	0,911
Rata-rata	0,217	0,168	0,152

Keterangan :

P1 : Preservasi ovarium pada suhu 37°-38°C selama 2 jam (kontrol).

P2 : Preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 11-12 jam.

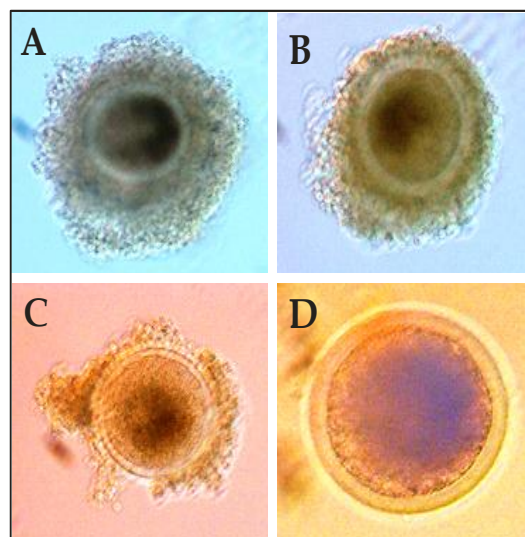
P3 : Preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 24-25 jam.

Hasil analisis statistik dari ketiga perlakuan tersebut menunjukkan bahwa preservasi ovarium berbeda nyata terhadap diameter folikel, maka terima H_1 . Hasil berbeda nyata ini perlu dilakukan uji lanjut Duncan yang hasilnya bahwa P1 berbeda nyata terhadap P2 dan P3, sedangkan P2 tidak berbeda nyata terhadap P3.

Hasil berbeda nyata menunjukkan pada P1 telah memberikan pengaruh terhadap penyusutan ukuran diameter folikel tertinggi dikarenakan folikel tidak lagi mendapatkan suplai darah seperti kondisi di dalam tubuh. Hal ini dikarenakan darah memiliki fungsi membawa nutrisi bagi jaringan maupun organ di dalam tubuh. Kondisi tersebut diduga menjadi faktor terjadi penyusutan atau mengecilnya ukuran pada jaringan folikel. Kondisi ini disebut atrofi. Hal ini sependapat dengan Kumar dkk (2013), atrofi

merupakan kondisi pengecilan ukuran pada jaringan maupun organ.

Berbeda dengan P2 maupun P3 yang mengalami penyusutan ukuran folikel lebih rendah dibandingkan dengan P1 pada suhu 37°-38°C. Hal ini dikarenakan preservasi ovarium yang telah dilakukan pada P2 maupun P3 suhu 4°-5°C dapat menekan angka penyusutan ukuran diameter folikel. Kondisi ini diduga bahwa suhu 4°-5°C dapat memperlambat aktifitas metabolisme sel di dalam folikel sehingga ukuran diameter tidak menyusut terlalu tinggi. Dugaan ini sejalan dengan Petrucci dkk (2010), manfaat preservasi pada suhu dingin yaitu 4°C untuk memperlambat kerja metabolisme sel sehingga akumulasi asam dapat dihambat sampai waktu tertentu.



Gambar 1. Kriteria Kualitas Oosit Domba Lokal (Pengamatan dengan *Microscope Inverted Software DP-2 BSW* Pembesaran 20 x 10)

Penyusutan ukuran diameter folikel pada kondisi P2 maupun P3 tidak hanya diakibatkan oleh melambatnya aktifitas metabolisme sel namun diduga pula telah terjadi kerusakan dinding membran folikel saat ovarium dipisahkan dari tubuh ternak dan suplai darah yang terhenti dapat juga menyebabkan iskemia. Iskemia diduga dapat mengakibatkan perubahan metabolisme sel dari aerob menjadi anaerob. Menurut Wongsrikeao *et al* (2005), kondisi anaerob menunjukkan metabolisme sel-sel ovarium akan menghasilkan asam laktat dan asam fosfat sehingga meningkatkan jumlah ion H^+ yang mudah masuk ke dalam pori-pori membran plasma. Zat cair yang mudah masuk ke dalam membran akan mengakibatkan mekanisme fisiko kimia. Mekanisme fisiko kimia yaitu perpindahan larutan NaCl sebagai media preservasi menuju cairan yang berada di dalam folikel mengakibatkan ukuran folikel membesar yang dikenal dengan hipotonis. Dugaan tersebut sejalan dengan Carvalho *et al* (2001), akumulasi asam dan peningkatan ion-ion akan menyebabkan perubahan pH dan osmolalitas membran selular menjadi *permeable*, sehingga larutan masuk ke intrasel yang menyebabkan degenerasi sel. Menurut Bone (1988), penggunaan NaCl fisiologis yang merupakan larutan elektrolit dapat mengakibatkan mekanisme osmosis terhadap folikel maupun oosit di dalamnya.

Oleh karena itu, semakin lama preservasi berlangsung maka perpindahan volume suatu zat cair dari media preservasi akan semakin banyak menuju suatu jaringan maupun organ. Hal ini bahwa pada P3 menunjukkan penyusutan ukuran diameter folikel lebih kecil dibandingkan dengan P2. Artinya pada P3 telah terjadi masuknya larutan NaCl ke dalam folikel lebih banyak dibandingkan dengan P2 walaupun secara statistika tidak berbeda nyata diantara kedua perlakuan tersebut.

Rataan persentase jumlah kualitas oosit A dan B menunjukkan angka tertinggi terdapat

pada P1 yaitu 75,50% diikuti pada perlakuan P2 telah menunjukkan adanya penurunan rata-ran persentase jumlah kualitas oosit A dan B yaitu 57,83%, dan selanjutnya rata-ran persentase jumlah kualitas oosit A dan B terus menurun pada P3 yaitu berjumlah 13,00%. Hasil uji lanjut menunjukkan kualitas oosit A maupun oosit B baik P1 atau P2 memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap P3, namun P1 tidak berbeda nyata terhadap P2. Secara lebih rinci, kualitas oosit pasca preservasi dapat diamati pada Tabel 2.

Menurut Gordon (2003), kualitas oosit A dan B dapat digunakan sebagai bahan dasar dalam penerapan teknologi IVF untuk memproduksi embrio. Hasil berbeda nyata P1 waktu preservasi ovarium saat transportasi dengan lama perjalanan 2 jam pada suhu 37° - $38^{\circ}C$ menunjukkan rata-ran jumlah persentase kualitas oosit A dan B yang paling tinggi dibandingkan dengan P2 maupun P3. Hal ini menguatkan penelitian yang telah dilakukan Engcong dan Karja (2013), preservasi pada suhu 37° - $38^{\circ}C$ selama 2 jam menghasilkan jumlah kualitas oosit A paling tinggi dibandingkan selama 5-7 jam maupun 8-10 jam dan suhu media yang diatur mendekati kondisi yang hampir sama dengan suhu di dalam tubuh ternak kisaran 37° - $38^{\circ}C$. Lokasi antara TPH dengan laboratorium yang merupakan tempat untuk mengoleksi oosit memiliki jarak yang perlu ditempuh, hal ini mengakibatkan ovarium perlu dipreservasi terlebih dahulu. Perlakuan P1 yang diberikan merupakan upaya untuk mempertahankan kualitas oosit pada keadaan ovarium masih segar (*fresh*) selama 2 jam pada suhu 37° - $38^{\circ}C$. Hal ini sependapat dengan Choi *et al* (2004); Engcong dan Karja (2013); Tellado *et al* (2014), melakukan preservasi ovarium karena adanya jarak yang perlu ditempuh antara TPH dengan laboratorium sehingga perlu diatur suhu tertentu selama perjalanan (transportasi) guna kualitas oosit agar dapat dipertahankan.

Tabel 2. Rataan Persentase Jumlah Oosit Berdasarkan Kriteria Kualitas Oosit Setelah Preservasi Ovarium

Perlakuan	Jumlah Oosit	Rataan Jumlah Oosit			
		A	B	C	D
		 %			
P1	86	32,67	42,83	21,67	2,83
P2	95	28,33	29,50	19,00	23,67
P3	73	0,00	13,00	47,50	39,50

Keterangan :

P1 : Preservasi ovarium pada suhu 37°-38°C selama 2 jam.

P2 : Preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 11-12 jam.

P3 : Preservasi ovarium pada suhu 4°-5°C selama 24-25 jam

Preservasi ovarium P2 dengan waktu preservasi 11-12 jam pada suhu 4°-5°C kualitas oosit A dan B dari jumlah rataannya yaitu 57,83%, data tersebut menunjukkan bahwa perlakuan pada P2 telah terjadi penurunan rataannya jumlah persentase kualitas oosit dibandingkan dengan P1 yaitu 75,50%. Kondisi ini diduga karena adanya pengaruh lama preservasi ovarium maupun suhu yang diberikan terhadap kualitas oosit. Dugaan ini sejalan dengan Klumpp (2001) dan Gordon (2003), faktor seperti waktu dan suhu penyimpanan ovarium sangat mempengaruhi kualitas oosit. Umumnya pada P2 rataannya jumlah persentase kualitas oosit A dan B masih dapat dikatakan baik karena jumlahnya lebih tinggi dibandingkan dengan rataannya jumlah persentase kualitas oosit C dan D (42,67%). Hasil ini menguatkan pendapat Engcong dan Karja (2013), preservasi ovarium pada suhu 4°C selama 8-10 jam menunjukkan persentase kualitas oosit A dan B masih dapat dipertahankan, hal ini pun sesuai dengan dugaan sementara bahwa preservasi ovarium yang dilakukan pada suhu 4°-5°C selama 11-12 jam diduga masih mampu mempertahankan tingkat kriteria kualitas oosit A dan B yang dapat dijadikan sebagai sumber genetik potensial teknologi IVF.

Preservasi ovarium P3 selama 24-25 jam pada 4°-5°C (suhu dingin) menunjukkan penurunan rataannya jumlah persentase kualitas oosit A dan B yakni 13,00%. Hal ini diduga akibat preservasi suhu dingin apabila dilakukan semakin lama akan menyebabkan rataannya jumlah persentase kualitas oosit A dan B terus menurun. Hasil ini sependapat dengan Carvalho *et al* (2001), oosit domba lebih rentan terhadap suhu dingin karena membran lipid pada oosit tidak mampu bertahan pada suhu dingin. Suhu dingin dapat menyebabkan hilangnya integritas dari membran oosit (Wongsrikeao *et al.*, 2005).

Seiring lama preservasi berlangsung seperti pada P3 tanpa adanya penambahan jenis zat apapun ke dalam media preservasi mengakibatkan persentase jumlah kualitas oosit A dan B yang didapat terjadi penurunan secara drastis. Oleh karena itu, kondisi tersebut akan menyebabkan lamanya iskemia. Sebaliknya apabila terdapat penambahan zat yang dapat memberikan nutrisi maka kualitas oosit dapat dipertahankan walaupun preservasi selama 24 jam. Dugaan ini sependapat dengan Khillare (2008), penambahan zat seperti serum sebanyak 15% ke dalam media preservasi pada suhu 5°C (dingin) akan mempertahankan kualitas oosit selama 24 jam.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat diambil simpulan sebagai berikut ini: Waktu preservasi ovarium memberikan pengaruh yang nyata terhadap ukuran folikel dan kualitas oosit.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Tim Dosen di Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran.

Daftar Pustaka

- Akcaay.E., Oysal, O., Yavas, I & U. An., 2008. The effects of serum, steroid and gonadotrophins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *J. Anim. And Vet. Advances* 7: 178-183.
- Bone, J.F. 1988. *Animal Anatomy and Physiology*. 3th ed. Prentice-Hall, Inc. A Division of Simon & Schuster Englewood Cliffs. New Jersey USA. 19, 368, 412.

- Carvalho F.C., C.M. Lucci, J.R. Silva, E.R. Andrade, S.N. B  o, and J.R. Figueiredo. 2001. Effect of Braun-Collin and Saline Solution at The Different Temperature and Incubation Time on The Quality of Goat Preantral Follicles Preserved in Situ. *Animal Reproduction Science* 66: 195-200.
- Choi, Y.H., L.M. Roasa, C.C. Love, S.P. Brinsko, and K. Hinrichs. 2004. Blastocysts Formation Rates In Vitro and In Vitro Maturation Equine Oocytes Fertilized Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biology Reproduction* 70: 1231-1238.
- Dinas Peternakan Jawa Barat. 2013. *Statistik Pemotongan Ternak Tahun 2012-2013*. Available at : <http://disnak.jabarprov.go.id> (diakses 17 April 2015, jam 14:06 WIB).
- Engcong, D.M. dan N.W. Karja. 2013. Kualitas Oosit Domba dari Ovarium Setelah Penyimpanan pada Suhu dan Periode Waktu yang Berbeda. *Acta Veterinaria Indonesiana* 1(2): 44-49.
- Gaspersz, V. 1995. *Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan, Jilid 1*. Tarsito. Bandung. 123-131, 198-204.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory of Production Cattle Embryo*. 2nd ed. CABI Publishing. Wallingford.
- Kumar, V., A.K. Abbas., and J.C. Aster. 2013. *Cell Injury, Cell Death, and Adaptations*. In: Robbins. *Basic Pathology*. 9th ed. Elsevier Inc. Canada. 5-17.
- Khillare, K.P. 2008. *Recovery and Preservation of Goat Follicular Oocytes*. Veterinary World, Vol.1 (3). Departement of Gynecology and Obstetrics, Collage of Veterinary and Animal Science. Parbhani. 73-74.
- Klumpp, A. M. 2001. *The Effect of Holding Bovine Oocytes in Follicular Fluid on Subsequent Fertilization and Embryonic Development*. Thesis. Loumurna State University. California. 20.
- Lopez, A.P., R.R. Santo., J.J. Holland. C.M., Aline. P.M.Robert., N.C. Claudio., C.Campello., J. Roberto.,V.V Sonia., N.B.K. Jewgenew.. J.R. Figuerido., 2008. Short-Term Preservation of Canine Preantral Follicles: Effects of Temperature, Medium and Time. *Animal Reproduction Science*. 114:201-214.
- Petrucchi, R.H., F.G. Herring, and J.D. Madura. 2010. *General Chemistry Prinsipale and Modern Application*. 10th ed. Prentice-Hall Inc.
- Silva, J.R.V., Alline., Regiane R.D.S., Sonia H.F.C., Ana, P.R.R., Marcos, A..L.F., Vanessa, P.M., Jose, R.F., 2003. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciência Rural, Santa Maria*.33:913-919.
- Tellado, M.N., G.M. Alvarez., G.C. Dalvit., and P.D. Cetica. 2014. *The Conditions of Ovary Storage Affect The Quality of Porcine Oocytes*. Advances in Reproductive Sciences (2). School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires. Argentina. 57-67.
- Widyastuti, R., Rasad, S.D. 2015. Tingkat Kematangan Inti Oosit Sapi Setelah 24 Jam Preservasi Ovarium. *Agripet*. 15 (2) : 72-78
- Wongsrikeao, P., T. Otoi, N.W. Karja, B. Agung, M. Nii, and T. Nagai. 2005. Effect of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes. *Jurnal of Reproduction and Development* 51: 87-97.