

## TINGKAT FERTILISASI OOSIT DOMBA DARI OVARIUM YANG DISIMPAN PADA SUHU DAN WAKTU YANG BERBEDA SECARA *IN VITRO*

### *Fertilization Rate of Sheep Oocytes Collected From Stored Ovaries at Difference Temperature and Time Period In Vitro*

Arie Febretrisiana<sup>1</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>, dan Ni Wayan Kurniani Karja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: febre\_arie@yahoo.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh suhu dan waktu penyimpanan ovarium terhadap tingkat fertilisasi oosit secara *in vitro* pada domba. Ovarium dibawa dari rumah potong hewan (RPH) dalam medium NaCl fisiologis pada suhu yang berbeda yaitu 27-28° C, 36-37° C, dan 4° C. Oosit kemudian dikoleksi dari setiap kelompok berdasarkan waktu penyimpanan yang berbeda yaitu 2-4, 5-7, dan 8-10 jam setelah domba dipotong. Oosit dikoleksi dan dimaturasi secara *in vitro* dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub>, 38,5° C selama 28 jam. Oosit kemudian difertilisasi ke dalam drop spermatozoa selama 14 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 38,5° C. Tingkat fertilisasi dievaluasi berdasarkan jumlah pronukleus yang terbentuk. Tingkat fertilisasi oosit yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu 27-28° C tidak berbeda dengan tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 36-37° C dan pada suhu 4° C, 2-4 jam setelah kematian hewan (masing-masing 53; 66,66; dan 63%) ( $P>0,05$ ). Tingkat fertilisasi oosit mulai mengalami penurunan pada tiga kelompok perlakuan setelah ovarium disimpan selama 8-10 jam, tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 27-28° C; 36-37° C; dan suhu 4° C masing-masing berturut-turut sebesar 9,8; 22,22; dan 12,24%. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu 27-28° C dan 36-37° C selama 5-7 jam dapat mempertahankan kompetensi oosit dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 4° C.

Kata kunci: ovarium, maturasi *in vitro*, oosit domba, suhu, waktu penyimpanan

#### ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effects of storage time and temperature of sheep ovaries on nuclear maturation of oocyte and *in vitro* fertilization rate of oocytes. The ovaries were stored in physiological saline for 2-4 h, 5-7 h, and 8-10 h at 27-28° C, 36-37° C and 4° C respectively. The oocytes were collected and matured *in vitro* for 28 h. Matured oocytes were then fertilized. There was no difference between the proportions of fertilization when collected from ovaries stored at 27-28° C, 36-37° C and 4° C for 2-4 h after slaughter (53, 66.66, and 63%, respectively) ( $P>0.05$ ). The same phenomena were shown for fertilization rate of oocyte from the ovaries stored for 5-7 h. However, fertilization rate decrease when stored for 8-10 h. The percentage of fertilization rate were 9.8, 22.22, 12.24% respectively for 27-28° C, 36-37° C, dan 4° C. Our finding indicates that the storage of ovaries at 27° C-28° C, 36-37° C for 5-7 h is effective in maintaining the developmental competence of sheep oocytes compares with 4° C.

Key words: Ovary, *In vitro* fertilization, sheep oocyte, temperature, time storage

#### PENDAHULUAN

Teknologi *in vitro fertilisasi* (FIV) merupakan salah satu bidang bioteknologi reproduksi yang dikembangkan untuk mengatasi permasalahan pada reproduksi hewan (Wolf dan Wooten, 2001). Teknik FIV memiliki kelebihan yang memungkinkan penerapan proses maturasi oosit, pembuahan dengan spermatozoa, dan perkembangan embrio dilakukan di luar tubuh hewan (Mamo, 2004). Keunggulan teknologi ini salah satunya dapat dimanfaatkan dalam upaya penyelamatan materi genetika dari hewan yang sudah mati. Upaya penyelamatan materi genetika sangat penting dilakukan terutama terhadap hewan-hewan langka yang sudah dikategorikan dalam status dilindungi, juga penyelamatan terhadap plasma nutfah ternak unggul di Indonesia.

Kualitas oosit dipengaruhi oleh lamanya waktu yang diperlukan untuk memanfaatkan oosit tersebut sejak kematian hewan. Kualitas oosit akan tetap terjaga apabila koleksi oosit dan pengerjaan proses FIV

dilakukan sesegera mungkin pasca kematian hewan. Akan tetapi karena keterbatasan sarana, peralatan dan jarak yang jauh dari lokasi kematian hewan dengan laboratorium FIV menyebabkan oosit tidak dapat segera dikoleksi. Setelah kematian hewan, ovarium akan kehilangan suplai oksigen dan energi akibat dari terputusnya aliran darah yang pada akhirnya menempatkan ovarium pada kondisi *ischemia* (Lopes *et al.*, 2009). Hal ini memicu perubahan metabolisme aerobik menjadi anaerobik yang kemudian terjadi produksi laktat dan proton. Selain hal tersebut, terjadi pula depolarisasi sel yang memicu gangguan pada keseimbangan ion yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel (Taylor, 2006).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kompetensi perkembangan oosit yang terkait permasalahan waktu dan suhu penyimpanan selama transportasi menuju laboratorium FIV pada berbagai spesies hewan, namun hasil yang didapatkan sangat beragam. Wang *et al.* (1995) melaporkan bahwa penyimpanan ovarium sapi pada suhu 4° C atau pada

temperatur kamar selama 24 jam menurunkan kemampuan oosit untuk berkembang. Matsushita *et al.* (2004) melaporkan bahwa penyimpanan ovarium sapi pada suhu 10-20° C selama 24 jam tidak menunjukkan pengaruh yang nyata pada kompetensi perkembangan oosit baik setelah maturasi maupun kemampuan embrio untuk membelah dan berkembang menjadi stadium blastosis setelah FIV. Selain itu, penelitian penyimpanan ovarium sapi juga dilakukan pada suhu 37° C selama 8 jam yang secara signifikan menunjukkan pengaruh menurunkan pada tingkat pembelahan embrio dan juga pembentukan blastosis setelah IVM/IVF (Yang *et al.*, 1990). Pada kuda, ovarium dapat disimpan selama 6-8 jam pada suhu 27-37° C selama transportasi tanpa memberikan pengaruh buruk terhadap tingkat maturasi dan integritas membran sitoplasma (Guignot *et al.*, 1999). Penelitian penyimpanan ovarium babi juga dilaporkan pada suhu 25-35° C selama 6 jam, kompetensi perkembangan oosit masih dapat terjaga (Wongsrikeao *et al.*, 2005).

Hingga saat ini informasi pengaruh waktu penyimpanan dan sensitivitas oosit domba terhadap suhu setelah IVF masih sangat jarang dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian untuk mengevaluasi waktu dan suhu yang optimal pada ovarium domba sangat penting dilakukan. Penelitian ini akan membantu penanganan yang baik bagi ovarium pasca pemotongan hewan dan dapat mempertahankan tingkat pematangan oosit sehingga mampu memperoleh kompetensi perkembangan oosit yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat fertilisasi oosit domba yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu medium yang berbeda yaitu pada suhu ruang 27-28° C, suhu 36-37° C dan suhu 4° C dan disimpan pada waktu penyimpanan yang berbeda yaitu selama 2- 4, 5-7, dan 8-10 jam.

## MATERI DAN METODE

### Transportasi Ovarium dari RPH Menuju Laboratorium

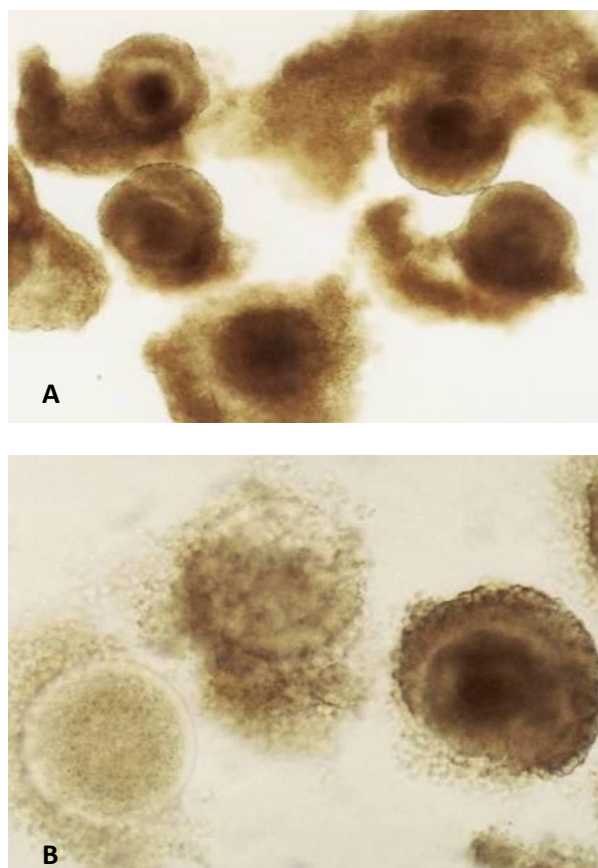
Ovarium domba dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) dan ditempatkan di dalam larutan 0,9% NaCl yang ditambahkan dengan 0,06 g/l penisilin dan 0,1 g/l streptomisin. Ovarium yang diperoleh dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan dengan suhu medium penyimpanan yaitu suhu 27-28° C, 36-37° C, dan 4° C.

Kelompok ovarium dengan suhu 27-28° C dibawa dengan menempatkan ovarium di dalam plastik yang berisi cairan NaCl fisiologis dan dibawa ke laboratorium. Kelompok ovarium dengan suhu 36-37° C ovarium ditempatkan di dalam plastik yang berisi NaCl fisiologis dan dimasukkan ke dalam termos yang diberi air dengan suhu 37° C. Kelompok ovarium dengan suhu 4° C dibawa dengan menempatkan ovarium di dalam plastik yang berisi NaCl fisiologis dan kemudian menyimpannya di dalam termos yang diberi *ice gel* di dalamnya. Setelah tiba di laboratorium, oosit dikoleksi masing-masing dari ketiga kelompok suhu penyimpanan pada 2-4 jam setelah pemotongan hewan. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk

kelompok penyimpanan selanjutnya yaitu oosit dikoleksi setelah 5-7 jam dan 8-10 jam setelah pemotongan. Penentuan 0 jam didefinisikan berdasarkan waktu awal pemotongan hewan di RPH.

### Koleksi dan Pematangan Oosit *In Vitro*

Koleksi oosit dilakukan dengan metode pencacahan (*slicing*) menggunakan pisau bedah steril dan oosit diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak. Hasil koleksi oosit dikategorikan dalam empat kelompok berdasarkan kualitas sitoplasma dan sel-sel kumulus. Penelitian ini hanya menggunakan oosit dengan kualitas yang baik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Oosit. A= Oosit dengan kualitas yang baik, B= oosit dengan kualitas yang tidak baik

Oosit dikoleksi di dalam medium *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah 0,3% *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, F-7524) dan penisilin-streptomisin 100 IU/ml. Oosit hasil koleksi dicuci dalam medium maturasi sebanyak dua kali dan selanjutnya dimaturasi dalam *tissue culture medium* (TMC) 199 (Sigma, USA) ditambahkan 5% FBS, 2 IU/ml *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (Intergonan, Intervet Deutschland GmbH), 2 IU/ml *human chorionic gonadotrophin* (hCG) (Chorulon, Intervet international B.V. Boxmeer-Holland), dan 10 µg/ml gentamisin (Sigma, G-1264). Oosit diletakkan ke dalam drop dari medium maturasi masing-masing 100 µl untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral oil (Sigma-Aldrich).

Inc, M-8410) kemudian dimaturasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> temperatur 38,5° C selama 28 jam.

**Fertilisasi In Vitro**

Fertilisasi *in vitro* dilakukan menggunakan semen beku domba garut yang berasal dari satu individu yang sama pada setiap kali IVF. Proses *thawing* dilakukan dengan menempatkan semen beku domba dalam air bersuhu 37° C selama 30 detik. Selanjutnya semen disentrifuga dengan 1600 rpm selama 5 menit dalam medium fertilisasi. Setelah disentrifuga, supernatan dibuang kemudian dilakukan spermatozoa diencerkan sampai konsentrasi spermatozoa sebesar 5x10<sup>6</sup> spermatozoa/ml.

Spermatozoa yang telah disiapkan kemudian ditempatkan dalam bentuk drop masing-masing sebanyak 100 µl pada cawan petri. Kemudian persiapan juga dilakukan pada oosit yang akan difertilisasi. Oosit yang telah dimaturasi selama 28 jam kemudian dicuci dalam medium fertilisasi sebanyak dua kali. Oosit kemudian dipindahkan ke dalam drop spermatozoa, masing-masing drop untuk 10-15 oosit dan kemudian diinkubasi selama 14 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 38,5° C.

**Evaluasi Tingkat Fertilisasi In Vitro**

Oosit yang telah dimaturasi dicuci dan dihilangkan semua bagian sel kumulus dengan bantuan 0,25% enzim hialuronidase dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet yang disesuaikan dengan

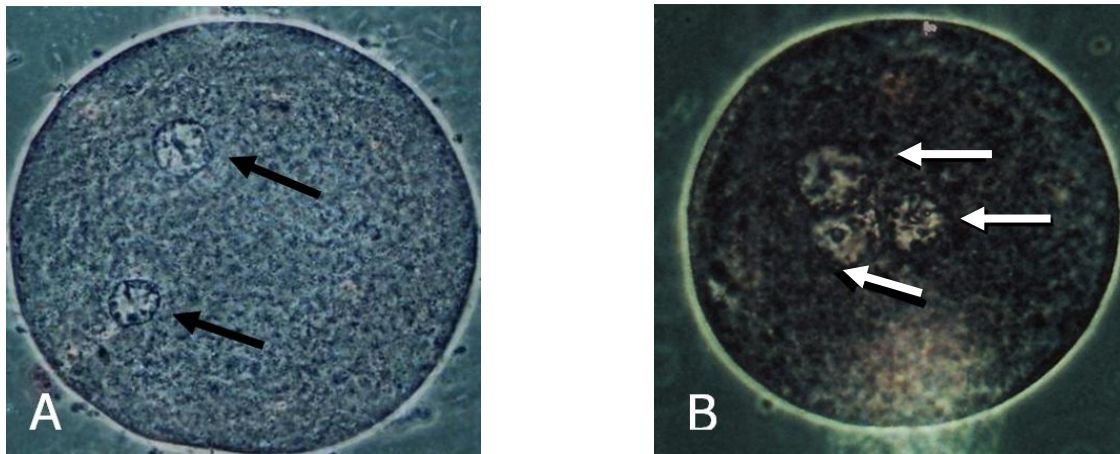
ukuran oosit. Kemudian oosit diletakkan pada drop 0,7% KCl di atas gelas obyek yang sebelumnya telah direndam dalam alkohol, lalu difiksir dengan cara ditutup dengan *cover glass* yang memiliki bantalan parafin dan vaselin (1:9) pada kedua sisinya. Preparat tersebut dimasukkan dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan etanol (1:3) selama 3 hari. Tingkat fertilisasi diamati dengan melihat terjadinya pembentukan pronukleus (PN). Oosit yang telah mengalami fertilisasi ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (2 PN) atau lebih (>2 PN) dalam sitoplasma oosit.

**Analisis Data**

Penelitian ini dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial. Tingkat-tingkat fertilisasi diulang sebanyak 4 kali. Data tingkat fertilisasi yang didapatkan yaitu jumlah oosit dengan status 1 PN, 2 PN dan >2 PN yang diperoleh juga dianalisis dengan analisis varian (ANAVA) dan kemudian diuji lanjut dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1993).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tingkat fertilisasi oosit domba diamati dengan melihat pembentukan pronukleus pada oosit (Gambar 2). Tingkat fertilisasi oosit domba yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu dan waktu penyimpanan yang berbeda disajikan pada Tabel 1.



**Gambar 2.** Pembentukan pronukleus (PN) pada oosit setelah proses fertilisasi. A= Oosit dengan 2 pronukleus (2 PN), B= Oosit dengan lebih dari 2 pronukleus (>2 PN), tanda panah= menunjukkan pronukleus.

**Tabel 1.** Tingkat fertilisasi oosit domba yang disimpan pada suhu dan waktu penyimpanan yang berbeda

Kelompok		Jumlah oosit	Pembentukan pronukleus			Tingkat fertilisasi
Waktu (jam)	Suhu (° C)		1 PN	2 PN	>2 PN	
2-4	36-37	44	6 (13,63)	21 (47,72) <sup>a</sup>	8 (18,18) <sup>ab</sup>	29 (66,66) <sup>a</sup>
	27-28	42	7 (16,66)	18 (42,85) <sup>ab</sup>	4 (9,52) <sup>ab</sup>	22 (53,00) <sup>ab</sup>
	4	55	5 (7,81)	19 (27,14) <sup>bc</sup>	13 (18,57) <sup>a</sup>	36 (63,00) <sup>ab</sup>
5-7	36-37	51	3 (5,88)	16 (31,37) <sup>b</sup>	11 (21,56) <sup>a</sup>	26 (50,00) <sup>ab</sup>
	27-28	52	3 (5,76)	9 (36,53) <sup>ab</sup>	7 (13,46) <sup>ab</sup>	26 (50,00) <sup>ab</sup>
	4	49	5 (10,20)	15 (30,61) <sup>bc</sup>	5 (10,20) <sup>ab</sup>	20 (40,81) <sup>b</sup>
8-10	36-37	54	0 (0,00)	7 (12,96) <sup>cd</sup>	5 (9,25) <sup>ab</sup>	12 (22,22) <sup>c</sup>
	27-28	51	5 (9,80)	4 (7,84) <sup>d</sup>	1 (1,96) <sup>b</sup>	5 (9,80) <sup>c</sup>
	4	49	0 (0,00)	5 (10,20) <sup>d</sup>	1 (2,04) <sup>b</sup>	6 (12,24) <sup>c</sup>

a, ab, b, bc, c, cd, d Superskrip huruf kecil yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada tiap perlakuan (P<0,05). PN= Pronukleus

Penyimpanan ovarium selama 2-4 jam tidak menunjukkan perbedaan tingkat fertilisasi meskipun tingkat fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium yang disimpan pada suhu 27-28° C lebih rendah yaitu sebesar 53% tetapi tidak berbeda dengan tingkat fertilisasi baik pada penyimpanan 36-37° C sebesar 66,66% maupun penyimpanan pada suhu rendah 4° C yaitu sebesar 63% ( $P>0,05$ ). Begitu juga waktu penyimpanan ovarium selama 5-7 jam, tidak menunjukkan perbedaan tingkat fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium yang disimpan pada ketiga kelompok suhu penyimpanan. Tingkat fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium yang disimpan pada suhu 27-28° C sama dengan tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 36-37° C yaitu sebesar 50%, sedangkan tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 4° C adalah sebesar 40,81% ( $P>0,05$ ). Tingkat fertilisasi oosit domba tidak mengalami penurunan tingkat fertilisasi hingga 5-7 jam penyimpanan. Perbedaan tingkat fertilisasi hanya terlihat pada tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 36-37° C selama 2-4 jam yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan tingkat fertilisasi oosit yang disimpan pada suhu 4° C selama 5-7 jam.

Tingkat fertilisasi oosit mulai mengalami penurunan yang signifikan setelah ovarium disimpan selama 8-10 jam. Penurunan ini terjadi pada ketiga kelompok penyimpanan suhu dan terlihat tidak ada perbedaan tingkat fertilisasi oosit baik yang disimpan pada suhu 27-28° C, 36-37°, maupun pada suhu 4° C. Persentase tingkat maturasi oosit yang berasal dari ovarium yang disimpan pada suhu 27-28° C adalah sebesar 9,8%, penyimpanan suhu 36-37° C adalah sebesar 22,22% sedangkan 12,24% untuk oosit yang berasal dari ovarium yang disimpan pada suhu 4° C.

Tingkat fertilisasi pada penelitian ini masih tinggi hingga penyimpanan 5-7 jam setelah pemotongan pada suhu 27-37° C dan 36-37° C. Hal ini kemungkinan disebabkan karena penyimpanan ovarium pada suhu hangat dapat menjaga keadaan yang baik di dalam folikel sehingga kualitas oosit masih dapat terjaga. Sirad dan Blondin (1996) yang mengemukakan bahwa kompetensi perkembangan oosit dapat ditingkatkan dengan menempatkan ovarium pada kondisi inkubasi yang hangat beberapa jam sebelum dilakukan proses koleksi. Kondisi ini memperlihatkan bahwa suhu 27-28° C dan 36-37° C dapat mempertahankan kualitas oosit tetap baik hingga 5-7 jam setelah pemotongan. Blondin *et al.* (1995) melaporkan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu hangat (30° C) selama 3-4 jam setelah pemotongan secara signifikan dapat meningkatkan kompetensi perkembangan oosit. Hal ini dapat terjadi karena empat jam setelah waktu pemotongan dapat menciptakan lingkungan mikro yang baik pada folikel yang spesifik, terjadi perubahan pada oosit yang menyerupai kondisi normal didalam tubuh hewan pada saat terjadi proses preovulatori folikel ketika akan terjadi proses ovulasi.

Metode penyimpanan dalam suhu dingin merupakan salah satu cara untuk mempertahankan

kemampuan sel untuk tetap hidup karena dengan penyimpanan dingin akan dapat memperlambat metabolisme sel sehingga dapat menurunkan kebutuhan oksigen dan dapat memperlambat akumulasi asam sebagai hasil dari proses apoptosis. Dasar dari semua proses biologi dan kimia yang terjadi di dalam sel adalah aktivitas molekuler dan mobilitas ion yang diatur oleh energi termal maka apabila terjadi penurunan suhu maka pergerakan molekuler akan diperlambat. Proses biokimia juga tidak terlepas dari proses interaksi antar molekul dalam reaksi-reaksi katalis oleh enzim dan metode pendinginan sangat berpengaruh pada semua komponen reaksi tersebut (Taylor, 2006). Akan tetapi Gardner *et al.* (2001) mengemukakan bahwa oosit dan embrio hewan dan manusia sangat rentan terhadap suhu dingin dan pembekuan. Özdaş *et al.* (2006) menyatakan bahwa oosit domba lebih rentan terhadap penyimpanan suhu dingin karena lingkungan folikuler disekitar oosit tidak mampu melindungi oosit dari kerusakan akibat suhu yang dingin. Meskipun Matsushita *et al.* (2004) menyebutkan bahwa lingkungan intrafolikel disekeliling oosit sapi mampu melindungi kerusakan oosit yang terjadi akibat penyimpanan pada suhu yang rendah. Metabolisme yang berbeda pada struktur oosit menyebabkan perbedaan reaksi sebagai akibat pengaruh suhu dingin pada oosit. Faktor yang berperan dalam pematangan oosit adalah protein pada oosit yaitu *mitogen-activated protein kinase* (MAP) dan *maturation promoting factor* (MPF) *cdc2-kinase*. Akan tetapi jumlah protein yang spesifik ini berbeda-beda pada tiap spesies sehingga terjadi perbedaan metabolisme pada tiap oosit (Gardner *et al.*, 2001). Lebih lanjut Matsushita *et al.* (2004) juga menyatakan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu dingin telah menyebabkan degenerasi struktur protein dan enzim.

Kerusakan akibat penyimpanan pada suhu dingin terjadi juga pada penelitian ini karena rendahnya tingkat fertilisasi oosit setelah penyimpanan 8-10 jam setelah pemotongan (Tabel 1). Menurut Taylor (2006) perubahan lingkungan oosit yang disebabkan oleh akumulasi hasil metabolisme dapat dicegah dengan proses pendinginan. Upaya penempatan sel pada suhu yang rendah dilakukan karena dapat memperlambat metabolisme, menurunkan kebutuhan oksigen, hasil metabolisme dapat dikurangi dan dapat menghemat energi. Akan tetapi menurut Arav *et al.* (1996) sensitivitas oosit terhadap pendinginan menunjukkan tingkat yang berbeda. Pada oosit yang *immature*, sensitivitas plasma membran terhadap pendinginan lebih tinggi dibandingkan dengan plasma membran oosit pada tahap metafase-II, sedangkan pada oosit yang matur menunjukkan kerusakan pada bagian *microtubule* dan mikrofilamen. Selain itu, rendahnya tingkat fertilisasi diduga karena beberapa efek samping yang terjadi akibat penyimpanan pada suhu rendah seperti terjadinya pengerasan *zona pellucida*, kerusakan pada mikrotubulus dan sitoskeleton, dan kerusakan pada membran sitoplasma, juga diamati pada oosit terkena suhu rendah selama transportasi ovarium (Lee *et al.*, 2006). Menurut

Wang *et al.* (2009), sitoplasma dan nukleus rentan terhadap cekaman panas maupun dingin. Penyimpanan ovarium *in vitro* dapat menyebabkan disorganisasi dari mikrotubulus, kerusakan kromosom, akumulasi metabolit, kenaikan indeks apoptosis sel granulosa, dan perubahan struktur membran *cytoplasmic* (Pedersen *et al.*, 2004; Wongsrikeao *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2006).

*Spindle* meiosis yang merupakan penyusun dari mikrotubulus dan memiliki fungsi penting untuk menyelaraskan kromosom dan pemisahan kromosom induk baik selama tahap maturasi maupun tahap fertilisasi. Selain itu juga oosit terdiri atas mikrofilamen aktin yang berfungsi mengontrol kejadian yang terjadi pada sitoplasma seperti orientasi spindle dan migrasi perifer, migrasi kortikal granulosa dan pembentukan polar bodi. Baik mikrotubulus maupun mikrofilamen bekerja bersama-sama untuk mengontrol fungsi spindle meiosis. Akan tetapi spindle meiosis diketahui sangat sensitif terhadap suhu dingin. Penyimpanan pada suhu dingin menyebabkan depolimerisasi mikrotubulus (Brunet dan Maro, 2005; Calarco 2005). Aman dan Parks (1994) melaporkan bahwa penurunan tingkat fertilisasi oosit berhubungan dengan depolimerisasi tubulin yang terjadi selama penyimpanan pada suhu dingin yang memicu kerusakan mikrotubulus dari spindle meiosis. Parks dan Ruffing (1992) menyatakan bahwa depolimerisasi mikrotubulus juga terjadi pada oosit yang disimpan pada suhu kamar. Penyimpanan oosit pada suhu dingin menyebabkan pengerasan pada zona pelusida yang dapat menyebabkan permasalahan pada rendahnya tingkat fertilisasi. Block dan Hansen (2007) melaporkan bahwa penelitian fertilisasi *in vitro* pada ovarium sapi menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk penyimpanan ovarium sapi adalah 25-30° C dan hanya mampu mempertahankan tingkat fertilisasi yang optimal selama 3-6 jam. Hasil tersebut tidak berbeda dengan penelitian ini, tingkat fertilisasi oosit domba masih dapat dipertahankan hingga penyimpanan selama 5-7 jam.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu 27-28° C dan 36-37° C selama 5-7 jam mampu mempertahankan kompetensi oosit lebih baik dibandingkan dengan penyimpanan ovarium pada suhu 4° C.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aman, R.R. and J.E. Parks. 1994. Effect of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.** 50:103-110.
- Arav, A., Y. Zeron, S.B.Leslie, E. Behoodi, G.B.Anderson, and J.H.Crowe. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiol.** 33:589-599.
- Block, J. and P.J. Hansen. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology.** 67:1518-1529.
- Blondin, P., L.A. Guilbault, and M.A. Sirard. 1995. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology.** 47:1061-1075.
- Brunet, S. and B. Maro. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. **Reproduction.** 130:801-811.
- Calarco, P.G. 2005. The role of microfilament in early meiotic maturation of mouse oocyte. **Microsc. Microanal.** 11:146-153.
- Gardner, K.D., A. Weissman, C.W. Howles, and Z. Shokam. 2001. **Textbook of Assisted Reproductive Techniques.** Martin Dunitz Ltd London.
- Guignot, F., J. Bezar, and E. Palmer. 1999. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after *in vitro* maturation. **Theriogenology.** 52:757-766.
- Lee, H.S., X.J.Yin, and I.K. Kong. 2006. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology.** 66:1468-1470.
- Lopes, C.A.P., R.R. dos Santos, J.J.D. Celestino, M.A.P. Melo., R.N. Chaves, C.C. Campello, J.R.V. Silva, S.N.B. ao, K. Jewgenow, and J.R. de Figueiredo. 2009. Short-term preservation of canine preantral follicles: effect of temperature, medium and time. **Anim. Reprod. Sci.** 115:201-214.
- Mamo, S. 2004. **Molecular Genetic Analysis of In Vitro Production Preimplantation Stage Bovine Embryos for Development Competence.** Culliver Verlag, Göttingen.
- Matsushita, S., T. Tani, Y. Kato, and Y. Tsunoda. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. **Anim. Reprod. Sci.** 84:293-301.
- Özdaş, O.B., A. Baran, M.Tas, U. Cirit, K. Demir, S. Bacinoglu, S. Pabuccuoglu, and K. Ak. 2006. Effect of different transport temperatures of cattle and sheep ovaries on *in vitro* maturation of oocytes. **Medycyna Wet.** 62(2):162-164.
- Parks, J.E. and N.A. Ruffing. 1992. Factor affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology.** 37:59-73.
- Pedersen, H.G., D.W.Elaine, E.E. Telfer. 2004. Effect of overy holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. **Theriogenology.** 62:468-480.
- Sakamoto, A., H. Iwata, H.Sato, T. Hayashi, T. Kuwayama, and Y. Monji. 2006. Effect of modification of ovary preservation solution by adding glucose on the maturation and development of pig oocytes after prolonged storage. **J. Reprod. Dev.** 52:669-674.
- Sirad, M.A. and P. Blondin. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 42:417-426.
- Taylor, M.J. 2006. **Biology of Cell Survival in the Cold: The Basis for Biopreservation of Tissues and Organs.** CRC-Taylor & Francis, Boca Raton, Florida.
- Wang, F.M., G.Z. Sang, J.G. Li, and S.X. Jin. 1995. Bisection and transfer of frozen embryos from Holstein cows. **J. of Hebei Agricultural University.** 18:68-70.
- Wang, J., H. Sui, D. Miao, N. Liu, P. Zhou, L. Ge, and J. Tan. 2009. Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. **Reproduction.** 137:181-189.
- Wolf, D.P. and M.Z. Wooten. 2001. **Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals.** Humana Press, New Jersey.
- 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 oocyte. **J. Reprod. and Dev.** 51:87-97.
- Yang, N., K. Lu, and I. Gordon. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocyte from stored ovaries. **Theriogenology.** 33:352 (abstrak).