

SELEKSI DAN KAPASITASI SPERMATOZOA
DENGAN METODE *PERCOLL GRADIENT* VKYUK FERTILISASI OOSIT
DAN PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO* PADA SAPI

[Selection and Capacitation of Spermatozoa Using the *Percoll Gradient* Method for *In Vitro*
Fertilization of Oocytes and Embryo Production in Cattle]

Endang Triwulanningsih¹, MR Toelihere², TL Yusuf², B Purwantara²,
K Diwyanto³ dan JJ Rutledge⁴

¹Balai Penelitian Ternak, P.O.Box 221 Bogor. 16002,

²FKH-IPB, Dannaga, Bogor

³Puslit Peternakan, Jl. Pajajaran Bogor

⁴Department of Animal Sciences, University of Wisconsin, USA

Email: etriwulanningsih@yahoo.com

ABSTRACT

This research has been conducted at the laboratory of in vitro fertilization of the University of Wisconsin, USA. These embryos may be used for improving genetic value of Indonesian cattle. Ovaries were collected from slaughterhouse in Wisconsin. Oocytes were matured in TCM-199 medium enriched with FSH 10 μ l/ml, estradiol 17 P 1 μ l/ml and 10 % FCS for 20 hours. The oocytes were fertilized in vitro with motile sperm selected and capacitated by using the *percoll gradient* with 2 ml vs 0.5 ml per layer as treatment A and B respectively. Sperm and oocytes were incubated in fertilization medium (mTALP) for 20 hours. All zygotes were cultured in CR1aa medium up to blastocyst stage and were fed with serum 5 μ l in culture medium on day 6. Percentages of cleavage, morula, blastocyst, expanded blastocyst, unfertilized and degenerated ova in this study were 86.3 vs 91.6 %, 53.3 % vs 75.9 %; 32.6 % vs 63.4 %; 21.1 % vs 33.0 %; 13.7 % vs 8.4 %, 32.9% vs 15.6 % for treatment A (n=1007) vs B (n=1055), respectively. Based on result of this study, it is concluded that the best method for IVP (in vitro production) of cattle embryos is using *percoll gradient* with 500 μ l per layer.

Kata kunci/ Key words: *Percoll gradient*, oosit/ oocytes, spermatozoa, blatisis lanjut/ expanded blastocyst, fertilisasi *in-vitro/ in-vitro* fertilization.

PENDAHULUAN

Keberhasilan fertilisasi in vitro (FIV) tidak hanya dipengaruhi oleh oosit saja, tetapi juga oleh spermatozoa yang digunakan untuk membuahnya. Metode kapasitas spermatozoa juga menentukan keberhasilan FIV. Telah diketahui bahwa produksi spermatozoa oleh seekor pejantan (spermatogenesis) merupakan suatu proses yang panjang, yang berlangsung di dalam testes, sampai kemudian hams mengalami proses kapasitas di dalam saluran reproduksi betina, sehingga spermatozoa mampu menembus zona pelucida oosit dan akhirnya membentuk zigot/embrio.

Gordon (1994) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa, reaksi akrosom dan adanya membran vitelin di oosit di mana terjadi kompetisi antar spermatozoa pada saat penetrasi spermatozoa adalah merupakan suatu faktor yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Proses kapasitas merupakan suatu proses reaksi biokimia dan fisiologi yang

kompleks, termasuk pengbilangan suatu komponen yang berasal dari tubuli semeniferi, epididimis, vas deferens dan seminal plasma yang diserap spermatozoa melalui membran spermatozoa. Selama proses dari testes, melalui epididimis, spermatozoa dimodifikasi hingga menjadi sel yang fertil yang disimpan di ekor epididimis hingga dilepaskan saat ejakulasi untuk menghindari kontaminasi oleh urine. Satu hal yang penting bahwa proses pendewasaan dan modifikasi spermatozoa terjadi pada permukaan. Spermatozoa yang meninggalkan testes dan masuk ke kaput epididimis belum mampu melakukan penetrasi ke oosit. Proses kapasitas perlu untuk dapat melakukan penetrasi pada oosit. Sebelum melakukan fertilisasi, spermatozoa harus melakukan migrasi melalui saluran reproduksi betina. Dalam perjalanan ini permukaan spermatozoa dilindungi oleh glikoprotein sebagai pelindung yang disekresi oleh epididimis dan berfungsi melindungi permukaan spermatozoa ketika garnet diekspos seminal plasma

saat ejakulasi. Proses kapasitasi ini harus berjalan secara *gradual* (bertahap) untuk menghilangkan pelindung tersebut dari permukaan spermatozoa terutama bagian akrosom.

Penambahan asam hyaluronic pada medium kultur dapat meningkatkan efisiensi produksi blastosis secara *in vitro*, demikianlah yang dilaporkan oleh Furnus *et al.* (1998). Pada penelitian tersebut metode fertilisasi menggunakan *Percoll gradient* 45% dan 90% masing-masing 2 ml per lapis. Konsentrasi spermatozoa 10×10^6 spermatozoa/ml dan inkubasi antara oosit dan spermatozoa selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂. Calon zigot dikultur di dalam medium SOF (*Synthetic Ovidust Fluids*) dengan penambahan asam hyaluronic sebanyak 0,5 mg/ml. Ternyata penambahan tersebut tidak efektif, tetapi bila ditambahkan sampai 1 mg/ml dapat meningkatkan persentase blastosis secara nyata ($p < 0,01$). Persentase blastosis di dalam medium kultur yang diberi asam hyaluronic (48%) lebih tinggi ($p < 0,01$) bila dibandingkan tanpa asam hyaluronic (35%). Sedangkan Im *et al.* (1995) melaporkan bahwa bila kapasitasi spermatozoa dengan menggunakan medium mTALP (*Tyroide Albumin Lactate Pyruvate*) akan dihasilkan oosit yang terfertilisasi 84,3% dan derajat pembelahan (*cleavage rate*) sebesar 56,9% lebih tinggi ($p < 0,01$) dibandingkan kapasitasi menggunakan medium BO (Brackett and Oliphant), dihasilkan 64,4% oosit yang difertilisasi dan derajat pembelahan 23,3%. Walaupun komposisi medium BO mirip dengan TALP, tetapi pada medium TALP mengandung Na laktat, hypotaurine dan epinephrine yang ternyata efektif dalam meningkatkan kapasitasi spermatozoa secara *in vitro*.

Chian *et al.* (1994) menyatakan bahwa sel kumulus sangat penting fungsinya untuk perkembangan *cytoplasmic* yang normal dari oosit secara *in vitro* dan penting pada saat induksi reaksi akrosom spermatozoa yang pada akhirnya akan meningkatkan derajat fertilisasi dan perkembangan embrio selanjutnya. Pada penelitian tersebut digunakan medium BO sebagai medium kapasitasi dan fertilisasi dengan konsentrasi spermatozoa 3-4 $\times 10^6$ ml yang diinseminasikan sebanyak 50 ml/5 0ml medium. Inkubasi oosit dan spermatozoa selama 8-

12 jam. Zigot dikultur di dalam medium TCM-199 dengan suplementasi 0.4 mM Na piruvat, 5 mM hemicalcium laktat dan 3 mg/ml BSA. Medium kultur diganti setiap 48 jam. Kemudian 120 jam setelah inseminasi, embrio dipindahkan ke dalam medium kultur yang diberi suplemen 5,56 mM glukosa dan teras dikultur hingga 168 jam setelah inseminasi. Hasil yang dicapai dengan metode ini adalah 52% (2-8 sel), 23% (8-32 sel), 9% morula dan 4% blastosis dari 159 oosit dengan kumulus yang kompak. Tetapi bila tanpa kumulus hanya diperoleh 50% (2-8 sel), 2% (8-32 sel) dan tidak ada yang mencapai morula maupun blastosis. Sedangkan Dominko dan First (1997) melaporkan bahwa oosit segera setelah terlihat *adanyapolar body* (sekitar 16 jam dalam medium maturasi) dilakukan inseminasi dan menghasilkan rasio jantan dan betina 33% vs 67% dan bila ditunda sampai 8 jam kemudian baru diinseminasi ternyata menghasilkan embrio dengan rasio jantan dan betina 64% vs 36%. Pada penelitian ini digunakan *percoll gradient* (90% dan 45%) masing-masing 2 ml per lapis untuk memisahkan sperma motil. Konsentrasi sperma untuk fertilisasi *in vitro* $1,0-2,5 \times 10^6$ spermatozoa/ml. Oosit setelah diinseminasi dikultur dalam medium CR_{ja}.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi tentang efisiensi metode kapasitasi spermatozoa dengan menggunakan teknik sentrifugasi *percoll gradient* guna meningkatkan persentase perkembangan embrio.

BAHAN DAN CARA KERJA.

Aspirasi dan Pematangan Oosit Secara In Vitro.

Ovaria dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan (RPH) di Milwaukee, Green Bay dan Madison, Negara Bagian Wisconsin, USA (Amerika Serikat) segera setelah sapi FH betina dipotong. Sapi yang dipotong adalah hanya sapi yang benar-benar sehat, yang sebelumnya telah diperiksa oleh tim kesehatan veteriner (USDA - United States Departement of Agriculture) secara intensif. Ovaria yang terkumpul langsung diambil dari abdomen sapi, kemudian dimasukkan dalam termos air panas tanpa media fisiologis. Ovaria yang terkumpul segera dibawa ke Laboratorium Fertilisasi *in vitro* Department of Animal Science, University of Wisconsin. Ovaria dibilas

dengan air suam-suam kuku dan ditempatkan dalam gelas piala di dalam penangas air bersuhu 37°C. Oosit diaspirasi dengan menggunakan pompa vakum yang bertekanan 5-7 psi dengan jarum suntik berukuran 18 G dan dihubungkan dengan tabung kerucut bervolume 50 ml langsung dari folikel berdiameter sekitar 2-5 mm tanpa menggunakan medium serta dihindari folikel yang besar dan *bloody follicles*. Setelah tabung aspirasi berisi sekitar 40 ml, tabung tersebut ditutup dan diganti dengan yang lain, sementara tabung yang penuh tetap diletakkan di dalam penangas air secara vertikal, maka oosit akan mengendap secara gravitasi. Oosit dan cairan folikel dipindahkan ke cawan petri bergaris yang berdiameter 10 cm dengan menggunakan pipet Pasteur yang panjang dan oosit dibilas tiga kali dalam TL Hepes steril. Setiap kali oosit dipindahkan dengan menggunakan *Hamilton syringe* dan *20 fA unopipette*. Setelah pembilasan selesai, 10 oosit ditempatkan dalam setiap tetes (50 μ l) medium pematangan yang terdiri atas TCM-199 yang ditambahkan FSH 10 ml/ml, estradiol 17 β 1 μ l/ml dan 10% *Fetal Calf Serum* (FCS) dan disimpan di dalam inkubator 5% CO₂ bersuhu 39°C selama 20 - 24 jam (Foto 1).

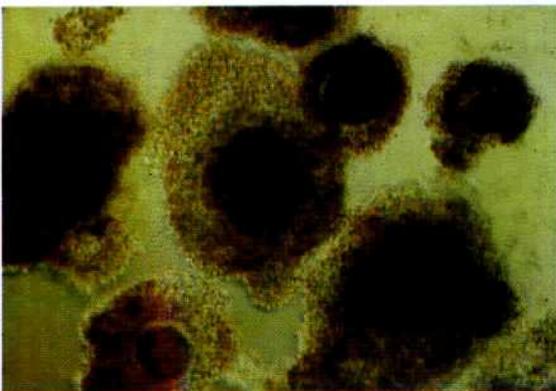


Foto 1. Oosit sapi dalam medium TCM-199

Fertilisasi In Vitro

Oosit yang sudah dimatangkan selama 20-24 jam dibilas sebanyak dua kali dengan medium TL Hepes terutama untuk menghilangkan glukosa dari media maturasi dan setiap 10 oosit ditempatkan dalam tetes (44 μ l) medium fertilisasi yang berupa modifikasi *Tyroide's Albumine Lactate Pyruvate* (TALP). Sperma beku yang digunakan dicairkan terlebih dahulu dalam penangas air 35°C, kemudian diletakkan di atas lapisan

larutan Percoll 45% (2 ml) dan 90% (2 ml) dalam tabung kerucut bervolume 10 ml (perlakuan A), kemudian dicentrifuge 2200 rpm (700G) selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang dan pellet spermatozoa dihitung konsentrasinya. Perlakuan B dengan menggunakan lapisan larutan Percoll 45% (0,5 ml) dan 90% (0,5 ml) dalam tabung kerucut bervolume 2 ml, kemudian dicentrifuge 2200 rpm (700G) selama tujuh menit, kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml TL Hepes dan di centrifuge selama 2 menit, supernatan dibuang sebanyak 900 μ l, kemudian dihitung konsentrasinya 1-2,5 X 10⁶ spermatozoa/ml, guna menghindari polyspermia. Pada perlakuan A tidak dilakukan pembilasan dengan TL Hepes setelah sentrifugasi yang pertama.

Pada perlakuan A (larutan percoll 90% dan 45%, 2ml per lapis) telah digunakan 1007 oosit, sementara pada perlakuan B (larutan percoll 90% dan 45%, 0,5ml per lapis) digunakan 1055 oosit.

Oosit yang sudah matang diinseminasi dengan 2 ml spermatozoa yang sudah diseleksi dan dikapasitasi dengan menggunakan Percoll gradient dan ditambahkan 2 μ l heparin dan 2 μ l phe (*penicillamine hypotaurine epinephrine*), kemudian dikultur di dalam inkubator 5% CO₂ yang bersuhu 39°C selama 20-24 jam (Foto 2). Metode fertilisasi ini dipergunakan sebagai perlakuan pada penelitian ini untuk melihat pengaruhnya terhadap perkembangan embrio, terutama persentase pembelahan (*cleavage*), ova yang tidak terbuahi, morula, blastosis dan blastosis lanjut (*expanded blastocyst*) yang dihasilkan sebelum embrio tersebut dibekukan.



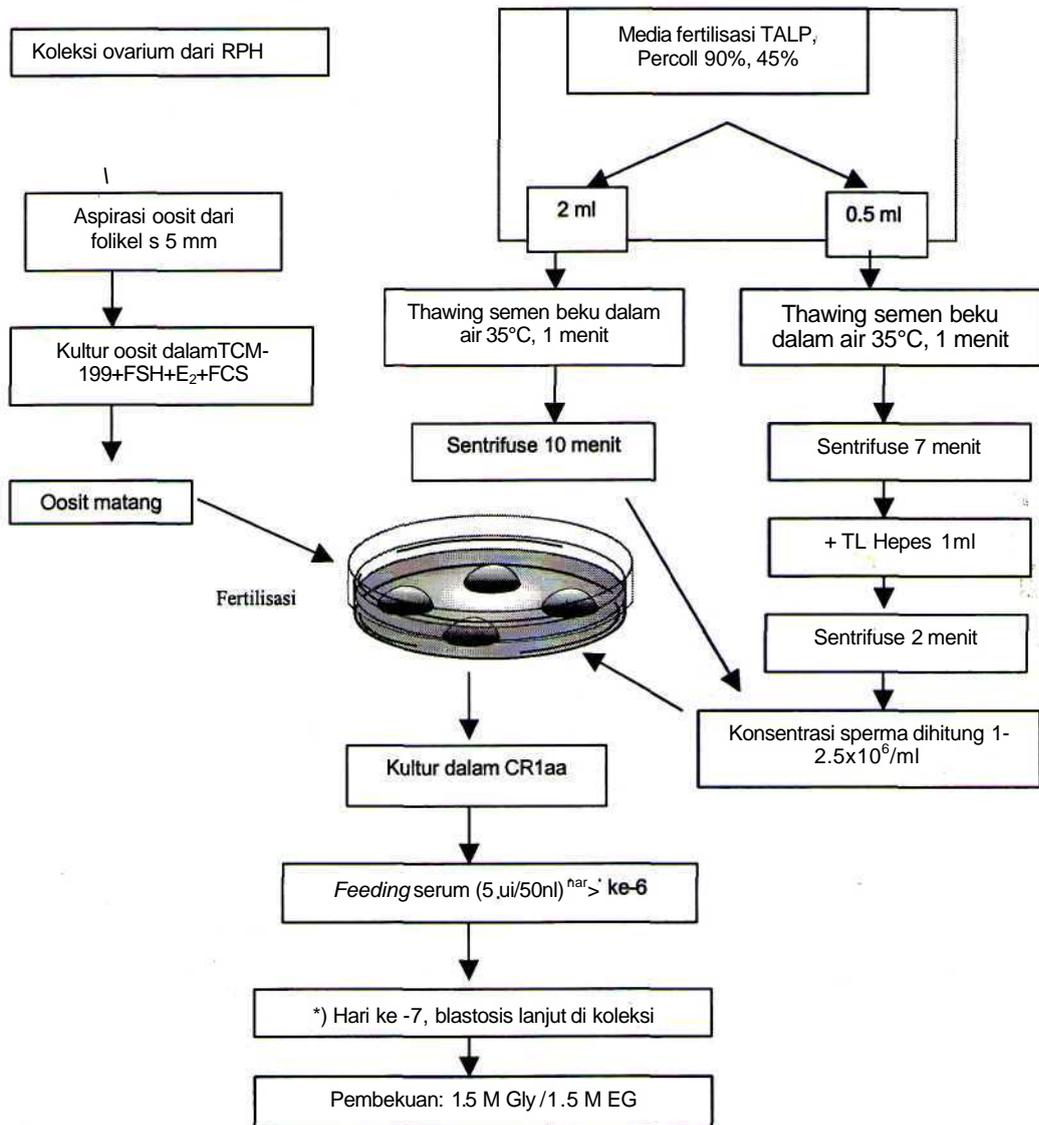
Foto 2. Oosit dan spermatozoa dalam medium fertilisasi

Kultur zigot

Setelah 20-24 jam oosit diinkubasi dengan spermatozoa, zigot dibilas dengan TL Hapes, di *vortex* selama tiga menit untuk menghilangkan sel-sel kumulus yang masih menempel di sekeliling oosit dan dibilas kembali dengan medium TL Hapes sebelum dimasukkan ke dalam tetes kultur medium CR1 aa (25 sigot/50 µl medium) selama 8 hari dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 39°C. Pada hari ke 7-7,5 blastosis lanjut yang berkualitas dikoleksi untuk dibekukan dengan 1,5M etilen glikol (untuk transfer langsung) dan 1,5 M gliserol (untuk transfer tidak

langsung) sebagai krioprotektan. Gambar 1 berikut ini menunjukkan bagan penelitian ini.

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah pembelahan, morula, blastosis, blastosis lanjut (*expanded blastocyst*), oosit tidak terfertilisasi dan degenerasi embrio. Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis dengan metode eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap, dengan program SAS untuk mengetahui metode terbaik kapasitas spermatozoa dengan menggunakan *Percoll gradient*. Model matematika yang digunakan adalah model linier umum, sebagai berikut: $Y_{ij} = \mu + T_i + s_{ij}$.



Gambar 1. Bagan alur percobaan metode seleksi dan kapasitas spermatozoa dalam produksi embrio *in vitro*

HASIL

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perkembangan embrio sapi *in vitro* sejak pembelahan sampai pada stadium blastosis lanjut akan lebih efisien, bila digunakan cara kapasitasasi dan pemisahan spermatozoa yang motil dan yang mati dengan menggunakan metode/perlakuan B (larutan percoll 45 % dan 90%, 0,5 ml per lapis) dibandingkan dengan metode/perlakuan A (larutan percoll 45% dan 90%, 2 ml per lapis). Persentase morula, blastosis dan blastosis lanjut (Foto 3) pada perlakuan percoll 0,5 ml per lapis (75,91%, 63,38% dan 33,02%) nyata lebih besar ($p < 0,01$) dibandingkan perlakuan percoll 2 ml per lapis (53,3%, 32,58% dan 21,06%). Persentase oosit tidak terfertilisasi pada perlakuan percoll 2 ml per lapis (A) sebesar 13,67% nyata lebih besar ($p < 0,01$) dibandingkan pada perlakuan percoll 0,5 ml per lapis (B), yang sebesar 8,36% (Tabel 1 dan Gambar 2). Dengan demikian dapat

dinyatakan bahwa *perlakuan percoll gradient* 0,5 ml per lapis lebih baik dibandingkan 2 ml per lapis yang memberi dua keuntungan, yaitu disamping menghemat bahan kimia karena larutan percoll sangat mahal harganya, juga dapat meningkatkan persentase oosit yang terbuahi sampai blastosis lanjut.

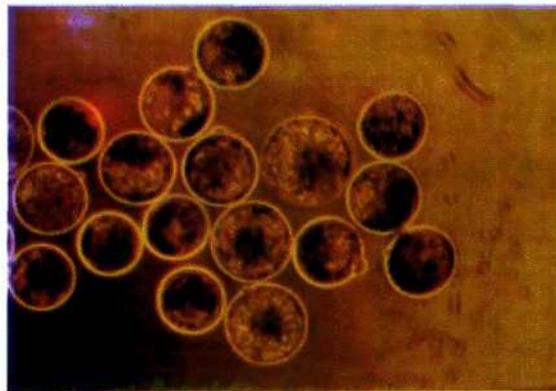
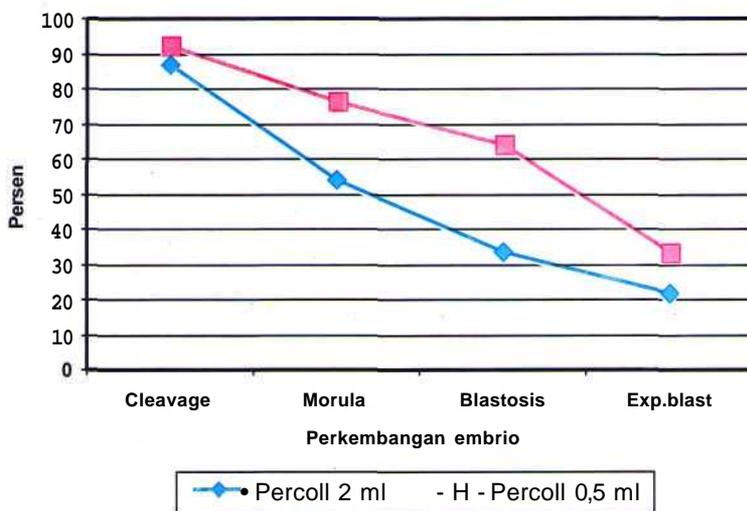


Foto 3. blastosis lanjut dalam medium kultur CR_{1aa}

Tabel 1. Pengaruh metode kapasitasasi spermatozoa terhadap rata-rata persentase perkembangan embrio secara *in vitro*.

Perlakuan Percoll gradient		Oosit yang berkembang				Oosit yang tidak berkembang	
		Pembelahan	Morula	Blastosis	Blastosis lanjut	Tidak terfertilisasi	Degenerasi
A (n=1007)	(n)	865	529	321	207	142	336
	(%)	(86,33) ["]	(53,3) ["]	(32,58) ^b	(21,06) ^b	(13,67) [*]	(32,94) ["]
B (n=1055)	(n)	968	793	654	322	87	175
	(%)	(91,64) [*]	(75,91) ^o	(63,38) [*]	(33,02) ["]	(8,36) ^b	(15,58) ["]



Gambar 2. Pengaruh metode kapasitasasi terhadap perkembangan embrio

PEMBAHASAN

Penggunaan metode *percoll gradient* lebih baik karena larutan *percoll* dalam pemisahan spermatozoa dianggap memenuhi syarat, sebab *percoll* mempunyai sifat yang diperlukan a.l.: dapat dibuat dalam berbagai densitas, viskositas rendah, tidak toksik, tidak dapat menembus membran sel, dapat disterilkan, tidak mempunyai efek negatif pada pemisahan spermatozoa, mudah dilepaskan dari zat yang dipisahkan, mudah membentuk *gradient* sendiri meski dengan pemutaran rendah (Kaneko *et al.*, 1983).

Larutan *percoll* mengandung partikel koloid silika yang dilapisi dengan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) berdiameter rata-rata 12-22 nm (dengan kisaran 15-30 nm), demikianlah menurut Dowson *et al.* (1996). Sementara itu panjang dan lebar spermatozoa sapi kira-kira 8-10 x 4-4,5 mikron, dengan diameter 0,4-0,8 mikron, sedangkan panjang keseluruhan mencapai 50-70 mikron (Toelihere, 1985).

Me Clure *et al.* (1989) menyatakan bahwa *Percoll* adalah medium yang terdiri atas partikel koloid yang diselaputi dengan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Pada penelitian ini, kemungkinan lapisan *percoll* yang lebih sedikit (0,5 ml per lapis) akan memudahkan spermatozoa untuk menembusnya dibandingkan lapisan *percoll* yang lebih banyak (2 ml per lapis). Pembilasan dengan TL Hepes sebelum dilakukan inseminasi akan membersihkan sisa larutan *percoll* pada permukaan membran spermatozoa dalam media fertilisasi yang mungkin akan mempengaruhi proses fertilisasi dan perkembangan embrio selanjutnya. Hal ini mungkin karena sifat *Percoll* yang mempunyai kapasitas buffer yang rendah, sehingga pH mudah berubah, sedangkan TL Hepes adalah buffer yang baik untuk suatu medium kultur. Spermatozoa motil akan mampu menembus lapisan *percoll* 90% seperti halnya secara *in vivo*, di mana lapisan mucus di servix sebagai medium untuk menyeleksi spermatozoa motil yang akan melakukan penetrasi pada oosit. Makin tinggi persentase spermatozoa yang motil, makin besar pula kesempatan oosit yang difertilisasi, sehingga makin tinggi pula persentase pembelahan dan perkembangan embrio selanjutnya.

Penggunaan larutan *percoll* untuk memisahkan spermatozoa motil pada penelitian FIV telah dilakukan

oleh beberapa peneliti sebelumnya, diantaranya Sharma *et al.* (1997) yang mempelajari kapasitas spermatozoa pada manusia dengan metode *swim-up* dibandingkan dengan *percoll gradient* (80%) satu lapis; ternyata lebih baik ($p < 0,01$) bila menggunakan metode *percoll gradient* 80%. Penelitian selanjutnya membandingkan penggunaan *percoll gradient* satu lapis dengan dua lapis (47% dan 90%, masing-masing satu ml). Analisis dilakukan terhadap persentase motilitas, persentase abnormalitas, persentase pembengkakan ekor pada uji HOS (*hypo-osmotic swelling test*) dan persentase viabilitas, menunjukkan bahwa pemisahan spermatozoa motil dengan menggunakan prosedur *percoll* dua lapis lebih baik ($p < 0,01$) untuk meningkatkan persentase spermatozoa motil dibandingkan dengan prosedur satu lapis *Percoll*. Sementara itu Rho *et al.* (2001) yang mempelajari metode seleksi dan kapasitas spermatozoa pada kambing dengan membandingkan metode *percoll gradient*, *swim-up* dan *glass-wool filtration*. Persentase pembelahan 62% dan blastosis 18%, bila menggunakan metode *percoll gradient*, dibandingkan 50% dan 11% bila menggunakan metode *swim up* dan bila menggunakan metode *glass-wool filtration* didapat persentase pembelahan 45% dan blastosis 9%; jelas penggunaan metode *percoll gradient* adalah yang terbaik untuk memisahkan spermatozoa motil dari semen beku guna produksi embrio *in vitro* kambing. Pada penelitian ini diperoleh hasil yang lebih baik (pembelahan 86,3% dan 91,6%, blastosis 32,6% dan 63,4% serta blastosis lanjut 21,1% dan 33,02%) masing-masing untuk perlakuan *percoll* (45% dan 90%) 2 ml dan 0,5 ml per lapis. Hasil ini juga lebih baik bila dibandingkan dengan yang diperoleh Rosenkrans *et al.* (1993) yang mendapatkan persentase pembelahan 68,2% dari 425 oosit. Kapasitas spermatozoa memakai *percoll gradient* 45% dan 90% masing-masing dua ml per lapis, dan setelah difertilisasi oosit dikultur dalam media yang mengandung lima mM hemicalcium L-lactate dan piruvat dengan konsentrasi antara 0,2-5 mM.

Metode kapasitas *swim up* dengan menggunakan medium TALP dan konsentrasi spermatozoa 2×10^6 per ml juga telah dilakukan oleh Han *et al.* (1994). Setelah difertilisasi, calon zigot

dikultur dalam medium SOF (*Synthetic Oviduct Fluids*) dibandingkan dengan di dalam ko-kultur sel granulosa *monolayer*. Blastosis yang didapat masing-masing 16% dan 13%. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian ini, yaitu persentase blastosis lanjut sebesar 21,06% dan 33,02% masing-masing untuk kapasitas dengan menggunakan Percoll *gradient* (45% dan 90%) 2 ml dan 0,5 ml per lapis.

Hasler *et al.* (1995) melakukan kapasitasasi spermatozoa dengan menggunakan Percoll *gradient* (45% dan 90%) dua ml per lapis dan konsentrasi spermatozoa 2×10^6 per ml terhadap oosit yang diaspirasi langsung dari ternak hidup, menghasilkan persentase pembelahan sebesar 77,4% dan blastosis 44,6%. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan hasil penelitian ini, mungkin karena oosit didapat dari ternak hidup sedangkan pada penelitian ini oosit diperoleh dari RPH. Kualitas oosit juga sangat berpengaruh terhadap keberhasilan produksi mebrio hasil fertihisasi *in vitro*. Medium fertilisasi dan kultur juga dapat mempengaruhi keberhasilan perkembangan embrio.

Pada penelitian lain, McHugh *et al.* (1994) melakukan fertilisasi *in vitro* dengan metode kapasitasasi yang sama dengan perlakuan A (2 ml per lapis larutan Percoll 45% dan 90%) pada semen *Bos bison*, dengan pemberian heparin yang berbeda (2 μ l dibandingkan 8 μ l/ml) dan konsentrasi sperma yang berbeda pula (1, 3 dan 5 $\times 10^6$ ml). Ternyata persentase blastosis juga berbeda pada setiap perlakuan, yaitu antara 10% sampai 23%. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian ini (blastosis 32,58%). Sedangkan Totey *et al.* (1993) mempelajari pengaruh pejantan dan konsentrasi heparin pada fertilisasi *in vitro* kerbau, dengan menggunakan konsentrasi heparin 0, 10 dan 100 ng/ml dan konsentrasi sperma 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 dan 4×10^6 /ml dengan 3202 oosit kerbau. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, konsentrasi sperma 2×10^6 ml dan konsentrasi heparin 10 μ g/ml adalah yang optimal menghasilkan derajat fertilisasi. Makin tinggi konsentrasi heparin, makin tinggi pula derajat penetrasi sperma dan persentase polispermia. Sperma kerbau pada penelitian tersebut dikapasitasi menggunakan *percoll gradient* 90% dan 45% masing-masing dua ml.

Thompson *et al.* (1998) melaporkan hasil persentase blastosis 21,6%, 40,1% dan 39,4% pada hari ke tujuh bila digunakan serum BSA, FCS dan CT-FCS, dengan kapasitasasi sperma menggunakan *percoll gradient* 45% dan 90%, dua ml per lapis dan konsentrasi sperma 2×10^6 spermatozoa/ml medium, lalu calon zigot dikultur dengan media SOF yang ditambahkan serum sesuai perlakuan dengan penggantian media kultur setiap 48 jam. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penggunaan FCS lebih baik dibandingkan yang lain. Persentase blastosis yang diperoleh (40,1%) lebih baik dibandingkan penelitian ini (32,58%). Hal ini mungkin karena pengaruh medium kultur yang digunakan, yaitu CR1aa pada penelitian ini sedangkan Thompson *et al.* (1998) menggunakan SOF.

Sementara itu Trounson *et al.* (1994) melaporkan bahwa embrio sapi menggunakan asam asetat lebih banyak pada perkembangan awal embrio dibanding embrio domba. Lebih lanjut dinyatakan bahwa glukosa tidak merupakan faktor penghambat pertumbuhan embrio dua sel seperti halnya yang didapat pada embrio tikus, akan tetapi pemberiannya perlu mendapat perhatian. Dilaporkan bahwa caffein meningkatkan persentase blastosis bila diberikan bersama dengan sel epitel. Pemberian asam amino esensial dan non esensial sebagai sumber energi pada medium perribaikan dilaporkan dapat mempertahankan pertumbuhan embrio dengan catatan produksi amonium perlu dikontrol. Selanjutnya dikatakan bahwa penggunaan medium SOF dengan 8 mg medium BSA/ml menghasilkan 39% blastosis, lebih baik dibandingkan penelitian ini yang memperoleh blastosis 32,58%.

Kreysing *et al.* (1997) membandingkan penggunaan medium TALP dan BO (*Brackett and Oliphani*). Pada medium TALP digunakan calcium dua mM dan medium BO empat mM. Ternyata blastosis yang dihasilkan lebih tinggi pada TALP (15,7%) dibandingkan dalam medium BO (10,6%). Penelitian ini menggunakan medium TALP dan menghasilkan persentase blastosis (32,58% dan 63,38%) dan blastosis lanjut (21,06% dan 33,02%) lebih tinggi, masing-masing untuk perlakuan *percoll* 2 ml dan 0,5 ml per lapis. Pada penelitian Kreysing *et al.* (1997) juga dinyatakan bahwa medium TALP menggunakan

0,1 IU/ml heparin, penicilamin 20 μ M, hipotanrin 10 μ M dan epinefrin 1.01 M (phe) sebagai agen kapasitasi sperma. Sedangkan pada BO digunakan 0,1 IU/ml heparin dan lima mM caffeine. Hasil kapasitasi spermatozoa dengan BO ternyata banyak menimbulkan polispermi bila inkubasi oosit dan spermatozoa lebih dari sembilan jam, sedangkan pada medium TALP diperlukan waktu 18 jam untuk penetrasi spermatozoa dan fertilisasi.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa perkembangan embrio *in vitro* lebih baik ($p < 0,01$) difertilisasi dengan menggunakan spermatozoa yang dikapitasasi dengan metode percoll gradient 45% dan 90% masing-masing 0,5 ml per lapis (perlakuan B) dibandingkan 2 ml per lapis (perlakuan A).

SARAN

Untuk meningkatkan produksi susu ternak sapi perah lokal dapat dilakukan transfer embrio *in vitro* dengan sumber oosit dan spermatozoa dari pejantan unggul dari negara penghasil susu sapi yang mempunyai potensi genetik yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

Chian RC, Niwa K and Sirard MA, 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 41, 1449-1508.

Dowson RMC, Elliot DC, Elliot WH and Jones KM, 1986. *Data for Biochemical Research*. 3rd edition. Oxford Science. Publication. New York: 514-515.

Dominko T and First NL. 1997. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology* 47,1041-1050.

Furnus CC, de Matos DG and Martinez AG 1998. Effect of hialuronik acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 49,1489-1499.

Gordon I, 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. University, Cambridge. CAB International.

Im KS, Kim HJ, Chung KM, Kim HS and Park KW. 1995. Effects of ovary tipe, oocytes grade, hormone, sperm concentration and fertilization medium on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *AJAS* 8:123-127.

Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK and Fukui Y. 1994. Effects of quality and development stage on the survival of FIV-derived bovine blastocyst cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology* 42:645-654.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mover SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine FIV embryos and subsequent calving result. *Theriogenology* 43:141-152.

Kaneko, Yamaguchi J, Kobayashi T and Lizuka R. 1983. Separation of human X and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *J.Fertil. Steril.* 40:235-240.

Kreysing U, Nagai T and Nieman H. 1997. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine *in vitro* fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reprod.Fertil. Dev.*9:465-474.

McClure RD, Nunes L and Tom R. 1989. Semen manipulation: Improved sperm recovery and function with a two layer Percoll gradient. *Fertil. Steril.* 51:5.

McHugh JA, Monson RL, Leibfried-Rutledge ML and Rutledge JJ. 1994. Domestic cows can contribute to species preservation efforts. *Theriogenology* 41, 277 (Abstract).

Rosenkrans, Jr. CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction* 49: 459-462.

Rho GJ, Hahnel AC and Betteridge KJ. 2001. Comparisons of oocytes maturation times and three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology* Vol.56 :503-516

Sharma RK, Seifarth K and Agarwal A. 1997. Comparison of single and two layer Percoll separation for selection of motile spermatozoa. *Int.J Fertil WomensMed.* 42(6):412-7.

Toelihere MR. 1985. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Angkasa.

Trounson A, Pushett D, Maclellan IJ, Lewis IN and Gardner DK. 1994. Current status of *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (FIV) and embryo culture in human and farm animal. *Theriogenology* 41, 51-66.

Thompson JQ, Allen NW, McGowan LT, Bell ACS, Lambert MG and Tervit HR. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 49,1239-1249.