

## Kompetensi Maturasi dan Fertilisasi Oosit Domba Prapubertas Secara *In Vitro*

(*DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF MATURATION  
AND FERTILIZATION PREPUBERTAL SHEEP OOCYTES IN VITRO*)

Anita Hafid<sup>1</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>1,2</sup>,  
Mohamad Agus Setiadi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana;

<sup>2</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 Indonesia,

Telp: (0251) 8626460, Fax: (0251) 8623940

Email: [setiadi03@yahoo.com](mailto:setiadi03@yahoo.com)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan maturasi dan fertilisasi oosit dari ovarium domba prapubertas secara *in vitro*. Ovarium domba prapubertas dikoleksi berdasarkan ketidakhadiran korpus luteum atau ketidakhadiran korpus albicans pada kedua ovarium. Oosit dikoleksi dengan metode *slicing*. Hanya oosit dengan sitoplasma yang homogen dan sel kumulus yang kompak yang dipakai dan dimaturasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 39°C. Oosit difertilisasi secara *in vitro* menggunakan semen beku dengan konsentrasi 5x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL dan diinkubasi selama 12-14 jam. Pengamatan dilakukan terhadap kemampuan oosit mencapai tahap metafase II (MII) dan pembentukan pronukleus (PN). Hasil penelitian menunjukkan status inti oosit pada tahap MII tidak berbeda antara oosit domba prapubertas dan oosit domba pubertas (89% vs 90,7%, P > 0,05) setelah dimaturasi secara *in vitro*. Sementara tingkat fertilisasi oosit domba prapubertas lebih rendah (P > 0,05) dibandingkan dengan oosit domba pubertas (60,0% vs 77,7%). Kejadian polispermi pada oosit domba prapubertas cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan oosit domba pubertas (21,8% vs 7,4%) (P > 0,05). Dapat disimpulkan bahwa oosit domba prapubertas memiliki kemampuan maturasi yang sama dengan oosit domba pubertas namun memiliki kemampuan fertilisasi yang lebih rendah.

Kata-kata kunci: fertilisasi; maturasi; oosit; prapubertas.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the maturation and fertilization ability of oocytes from pre-pubertal sheep ovary *in vitro*. Prepubertal ovary were collected based on the absence of corpus luteum or absence of corpus albicans in both of the ovaries. Oocytes were collected by slicing method. Only the oocytes which categories of homogeneous cytoplasm and compact cumulus cells were used and it was matured for 24 hours in CO<sub>2</sub> incubator with temperature 39°C. Oocytes fertilized *in vitro* used post thawed spermatozoa with concentration 5x10<sup>6</sup> and incubated for 12-14 hours. Oocytes were evaluated on number of oocytes reached MII and number of PN formation. Result of the experiment revealed that there was no significant difference in the percentage of MII oocytes after *in vitro* maturation (89% vs 90,7%, P > 0,05) between prepubertal sheep and pubertal sheep. Meanwhile, the fertilization rate was significantly lower (P > 0,05) in prepubertal sheep oocytes compared to pubertal sheep oocytes (60% vs 77,7%). The incidence of polyspermic fertilization was higher in prepubertal sheep oocytes than pubertal sheep oocytes (21,8% vs 7,4%) (P > 0,05). In conclusion, prepubertal sheep oocytes and pubertal sheep oocytes have similar *in vitro* maturation ability, even though the ability to be fertilized of the prepubertal sheep oocytes is lower than the pubertal sheep.

Key words: fertilization; maturation; oocytes; prepubertal.

## PENDAHULUAN

Sumber oosit untuk produksi embrio *in vitro* (PEIV) pada ternak umumnya diperoleh dari ternak yang disembelih di rumah potong hewan (RPH). Ternak tersebut umumnya sudah mengalami pubertas disebabkan mekanisme hormonal (Hafez dan Hafez, 2000) dan ultrastruktur oosit (Hyttel *et al.*, 1997) hewan pubertas telah sempurna. Selain itu kriteria umum yang digunakan untuk pemilihan oosit pada PEIV mengacu pada kriteria sel kumulus yang kompak dan sitoplasma yang homogen, sehingga oosit yang diperoleh mendekati keseragaman. Perubahan sitoplasma menjadi hal yang penting untuk mendukung perkembangan embrio, termasuk di dalamnya yaitu mekanisme pengaturan kalsium, perubahan aktivitas *maturating promoting factor* (MPF), *mitogen activated protein kinase* (MAPK), dan pendistribusian organel sel (Anguita *et al.*, 2007).

Selain kriteria pemilihan oosit tersebut, oosit yang dikoleksi umumnya berasal dari folikel antral, hal ini karena oosit dari folikel antral merupakan oosit yang sedang tumbuh dan cenderung lebih aktif dalam melakukan proses transkripsi dan translasi untuk menghasilkan *ribonucleic acid* (RNA) dan protein yang penting untuk proses perkembangan selanjutnya (Hyttel *et al.*, 1997). Secara umum folikel antral memiliki diameter 2-4 mm pada domba dan 4-6 mm pada sapi (Evans, 2003). Sementara itu dilaporkan folikel antral pada kambing prapubertas berdiameter 2-6 mm (Velilla *et al.*, 2004) dan pada domba prapubertas telah mencapai ukuran diameter 4-6 mm (Kochhar *et al.*, 2002). Kauffold *et al.* (2005) juga melaporkan bahwa kemampuan perkembangan pada sapi prapubertas dan sapi pubertas meningkat pada folikel ukuran 2-3 mm. Selain itu ukuran diameter oosit yang sering digunakan yaitu 110-150  $\mu\text{m}$  pada domba (Shirazi dan Sadeghi, 2007) dan di atas 110  $\mu\text{m}$  pada sapi (Hyttel *et al.*, 1997). Kriteria tersebut sering dijadikan sebagai patokan dalam pemilihan oosit untuk PEIV, karena oosit yang telah mencapai diameter di atas 110  $\mu\text{m}$  dilaporkan memiliki kemampuan penuh untuk dapat menyelesaikan meiosis dan dapat mencapai maturasi inti sampai ke tahap MII (Cran *et al.*, 1980; Fair *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 1997).

Selain itu sumber oosit dari ovarium domba prapubertas menjadi hal yang menarik, karena

kesukaan masyarakat Indonesia mengonsumsi sate kambing atau domba muda yang banyak dikenal sebagai domba bawah lima bulan (Balibu), sehingga hal tersebut merupakan satu harapan baru untuk memperoleh sumber oosit dari rumah potong hewan untuk PEIV.

Kompetensi pertumbuhan oosit dari ovarium domba prapubertas diduga masih banyak kekurangan terkait dengan fungsi endokrin dan fisiologi. Dilaporkan pula bahwa beberapa organel sel pada oosit domba prapubertas belum sempurna seperti pada oosit yang berasal dari domba yang sudah mengalami pubertas (O'Brien, 1996). Namun demikian, beberapa penelitian menggunakan oosit yang berasal dari hewan prapubertas memperlihatkan kemampuan perkembangan yang baik, seperti pada kambing (Izquierdo *et al.*, 1998; Anguita *et al.*, 2007), sapi (Chohan dan Hunter, 2004, Alm *et al.*, 2006), babi (O'Brien *et al.*, 2000), dan tikus (Miyano, 2005). Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk dapat mengamati kemampuan perkembangan oosit domba prapubertas setelah dimaturasi dan difertilisasi secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Penelitian I: Kemampuan Maturasi Inti Oosit Domba Prapubertas

**Koleksi dan Maturasi Oosit.** Ovarium domba diperoleh dari RPH, ditempatkan dalam media transportasi NaCl fisiologis 0,9% yang ditambahkan antibiotik 100 IU/mL *penicillin* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dan 0,1 g/mL *streptomycin* (Sigma-Aldrich) dengan temperatur 35-37°C. Ovarium dari domba prapubertas diperoleh berdasarkan ketidakhadiran korpus luteum atau ketidakhadiran korpus albicans pada kedua ovariumnya (Pawlak *et al.*, 2012). Ovarium domba yang telah diperoleh ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui bobot ovarium.

Koleksi oosit dilakukan dengan metode *slicing* (mencacah) bagian korteks ovarium menggunakan *scalpel* untuk mengeluarkan oositnya. Teknik koleksi oosit dilakukan pada cawan petri yang berisi larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Sigma, USA), 100 IU/mL *penicillin* dan 0,1 mg/mL *streptomycin* yang terlebih dahulu diekuilibrasikan minimal selama dua jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 39°C.

Klasifikasi oosit dikategorikan ke dalam empat tipe mengacu kepada kriteria yang digunakan De Loos *et al.* (1989) yaitu kategori oosit tipe A; memiliki multilayer sel kumulus yang kompak, sitoplasma homogen, dan total *cumulus oocyte complexes* (COCs) terang dan transparan. Kategori oosit tipe B; memiliki multilayer sel kumulus yang kompak, sitoplasma homogen namun kelihatan kasar dan terdapat zona yang lebih gelap pada bagian tepi oosit dan total COCs sedikit lebih gelap dan kurang transparan. Kategori oosit tipe C; memiliki sel kumulus yang kurang kompak, sitoplasma tidak teratur, dan total COCs lebih gelap dibandingkan oosit tipe A dan B. Kategori oosit tipe D; memiliki sel kumulus yang sudah ekspan, sitoplasma tidak teratur, dan total COCs gelap dan tidak teratur. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit kategori tipe A dan B atau oosit dengan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak dengan lebih dari tiga lapisan tebal (Lonergan *et al.*, 1992).

Sebelum dimaturasi, oosit dicuci terlebih dahulu dalam media maturasi sebanyak dua kali. Media maturasi terdiri dari *tissue culture media* (TCM) 199 (Gibco, USA) yang disuplementasi dengan FBS 10%, *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) 10 IU/mL, *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) 10 IU/mL dan *gentamycin* (Sigma-Aldrich, Inc, P-4687) 50 µg/mL. Pematangan oosit dilakukan dalam media maturasi dalam bentuk *drop* masing-masing berisi 100 µL untuk 10-15 oosit. Kemudian *drop* ditutup dengan *mineral oil* (Sigma, USA) dan dimasukkan dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub>, pada suhu 39°C selama 24 jam.

**Evaluasi Tingkat Maturasi Oosit.** Oosit yang telah dimaturasi didenudasi sel-sel kumulusnya dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0,25% (Sigma, USA) dengan cara melakukan pemipetan berulang menggunakan pipet yang sesuai dengan ukuran oosit. Oosit yang telah dihilangkan sel-sel kumulusnya diletakan pada *drop* mPBS di atas *cover glass* yang memiliki bantalan paraffin dan vaselin di keempat sudutnya, kemudian difiksir pada kedua sisi bantalan paraffin dan vaselin. Preparat tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan *ethanol* (1:3) selama 48-72 jam.

Preparat kemudian diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama lima menit, kemudian

pewarna dibilas dengan 25% asam asetat. Pengamatan inti oosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus IX, Japan). Tingkat maturasi inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit yang dikelompokkan menjadi tahap *germinal vesicle* (GV) yaitu ditandai dengan membran inti dan nukleolus yang masih terlihat; tahap GVBD ditandai dengan membran inti pecah dan nukleolus tidak terlihat serta kromosom mulai terkondensasi; tahap metafase I (MI) ditandai dengan kromosom terkondensasi dan tersusun pada *spindle* metafase; anafase-telofase I (A-TI) ditandai dengan kromosom homolog mulai terpisah; tahap MII ditandai dengan hadirnya kromosom homolog dan badan kutub pertama telah terlihat (Gordon 2003). Keberhasilan maturasi inti oosit dinilai berdasarkan pada persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII.

## Penelitian II: Kemampuan Fertilisasi Oosit Domba Prapubertas

Koleksi dan maturasi oosit dilakukan sama dengan prosedur penelitian tahap 1. Oosit yang telah dimaturasi, selanjutnya difertilisasi secara *in vitro*. Semen beku *dithawing* di dalam penangas air/*waterbath* pada suhu 30-32°C selama 30 detik, kemudian dicuci dengan cara disentrifugasi dalam media fertilisasi mengacu pada metode Suzuki *et al.* (2000) pada kecepatan 700 G selama lima menit. Setelah disentrifugasi, supernatant dibuang hingga menyisakan endapan spermatozoa sekitar 200 µL, kemudian konsentrasi spermatozoa dihitung untuk menentukan jumlah media fertilisasi dan spermatozoa agar diperoleh konsentrasi akhir 5x10<sup>6</sup>/mL.

Campuran spermatozoa dan media fertilisasi dibuat dalam bentuk *drop* 100 µL untuk 10-15 oosit, kemudian ditutup dengan *mineral oil* (Sigma-USA). Oosit yang sudah dimaturasi dicuci dalam media fertilisasi sebanyak dua kali, kemudian dipindahkan ke dalam *drop* dan diinkubasi selama 12-14 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% temperatur 39°C.

**Evaluasi Tingkat Fertilisasi *In Vitro*.** Oosit yang telah difertilisasi kemudian difiksasi dan diwarnai menggunakan metode yang sama seperti pada evaluasi tingkat maturasi oosit. Penentuan tingkat kemampuan fertilisasi *in vitro* dilakukan berdasarkan pada pembentukan dan jumlah pronukleus (PN). Total oosit yang terfertilisasi adalah oosit yang mempunyai dua atau lebih PN. Fertilisasi normal ditandai

dengan terbentuknya dua PN, sedangkan oosit yang mempunyai lebih dari 2 PN dikategorikan sebagai polispermi.

### Analisis Statistika

Perbandingan status inti oosit dan oosit yang terfertilisasi pada masing masing kelompok (prapubertas dan pubertas) diuji secara statistika dengan menggunakan pengujian *t-student* (Steel dan Torrie, 1991). Data diolah menggunakan program *statview*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tingkat Maturasi Inti Oosit

Pada penelitian ini, ovarium domba prapubertas yang digunakan memiliki rata-rata berat 0,4 gram, lebih ringan dibandingkan dengan ovarium dari domba yang sudah mengalami pubertas 1,1 gram (Tabel 1).

Rataan bobot ovarium domba pubertas lebih berat dibandingkan dengan domba prapubertas, disebabkan hadirnya korpus luteum atau korpus albicans pada salah satu atau kedua ovarium. Korpus luteum akan bertambah berat secara cepat sampai sekitar pertengahan periode siklus pubertas (Boediono *et al.*, 1999).

Ketidakhadiran korpus luteum atau korpus albicans pada ovarium domba prapubertas

disebabkan belum terjadinya ovulasi. Hal tersebut karena sebelum pubertas *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH) *surge center* dan *tonic center* memiliki frekuensi amplitudo yang rendah, dan GnRH *tonic center* tidak mampu menstimulasi *luteinizing hormone* (LH) dari pituitary anterior. Frekuensi GnRH pada betina prapubertas yang lebih rendah, mengakibatkan rendahnya stimulus *pituitary anterior* untuk melepaskan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan LH, sehingga perkembangan folikel tidak menghasilkan estradiol dalam jumlah yang tinggi, akibatnya tidak terjadi ovulasi (Hafez dan Hafez, 2000).

Oosit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan oosit yang memiliki kategori tipe A dan tipe B baik dari ovarium domba prapubertas maupun ovarium domba pubertas. Dari kelompok oosit domba prapubertas dan oosit domba pubertas diperoleh hasil oosit tipe A (1,4 vs 1,0) ( $P \leq 0,05$ ), sedangkan oosit tipe B yaitu (2,6 vs 2,7) ( $P \leq 0,05$ ), dan tidak terdapat perbedaan yang nyata dalam perolehan pada kedua kriteria oosit tersebut (tabel 1). Sementara itu oosit tipe C juga tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (3,6 vs 3,0) ( $P \leq 0,05$ ), kecuali pada oosit tipe D terdapat perbedaan yang nyata (2,5 vs 1,3) ( $P \leq 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa ovarium domba prapubertas memiliki potensi yang tidak jauh

Tabel 1. Bobot ovarium dan kualitas oosit domba prapubertas dan pubertas.

Kelompok	Jumlah ovarium (pasang) (n)	Total Oosit (n)	Bobot ovarium per pasang (rata-rata $\pm$ SD) (g)	Kualitas Oosit n (rata-rata $\pm$ SD)			
				A	B	C	D
Prapubertas	27	278	0,4 $\pm$ 0,1	38 (1,4 $\pm$ 1,4)	72 (2,7 $\pm$ 1,3)	98 (3,6 $\pm$ 2,0)	70 (2,6 $\pm$ 2,0) <sup>a</sup>
Pubertas	28	228	1,1 $\pm$ 0,4	29 (1,0 $\pm$ 1,2)	77 (2,8 $\pm$ 1,4)	84 (3,0 $\pm$ 1,7)	38 (1,4 $\pm$ 1,1) <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup>superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P \leq 0,05$ ).

Tabel 2. Status inti oosit domba prapubertas dan pubertas setelah dimaturasi secara *in vitro*.

Kelompok	Total oosit (n)	Status Inti Oosit n (% $\pm$ SD)					
		GV	GVBD	MI	A/TI	MII	Deg
Prapubertas	55	1 (1,8 $\pm$ 4,5)	1 (1,8 $\pm$ 3,7)	1 (1,8 $\pm$ 4,1)	1 (1,8 $\pm$ 5,1)	49 (89,1 $\pm$ 1,9)	2 (3,6 $\pm$ 6,4)
Pubertas	55	0 (0,0 $\pm$ 0,0)	2 (3,6 $\pm$ 10,2)	2 (3,6 $\pm$ 5,9)	0 (0,0 $\pm$ 0,0)	49 (89,1 $\pm$ 10,2)	2 (3,6 $\pm$ 4,9)

Keterangan: GV: *germinal vesicle*, MI: metafase I, A: anafase, T: telofase, MII: metafase II, Deg: degenerasi.



berbeda dalam perolehan oosit yang baik dibandingkan dengan domba yang sudah mengalami pubertas, sehingga ovarium domba prapubertas memiliki potensi sebagai sumber oosit.

Keadaan sitoplasma oosit sangat mendukung penyebaran organel dan interaksi antar organel yang lain, demikian pula dengan keberadaan sel kumulus yang kompak yang dapat mendukung pematangan oosit melalui zat metabolit yang dihasilkan dan disekresikan melalui mekanisme *gap junction* ke oosit (De Loos *et al.*, 1989). Tidak adanya perbedaan pada oosit kategori tipe A maupun tipe B dari ovarium domba prapubertas dan domba pubertas diduga karena keadaan ultrastruktur antara keduanya sama. O'Brien *et al.* (1996) melaporkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada ultrastruktur termasuk distribusi organel intraseluler oosit domba prapubertas maupun oosit domba pubertas. Namun, ukuran mitokondria dan kortikal granula pada oosit domba prapubertas dilaporkan lebih kecil dibandingkan dengan oosit domba pubertas.

Tingkat maturasi inti oosit merupakan salah satu parameter dan indikator yang umum digunakan untuk mengetahui kompetensi perkembangan oosit selanjutnya. Selama proses maturasi terjadi perubahan proses meiosis (Gordon, 2003). Perubahan meiosis I dimulai dengan terjadinya GVBD setelah tahapan GV hingga mencapai tahap MII.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata pada oosit yang mencapai tahap MII dari domba prapubertas (89,1%) dibandingkan dengan oosit domba pubertas (89,1%) ( $P > 0,05$ ) (Tabel 2). Hal tersebut menunjukkan oosit domba prapubertas memiliki kemampuan yang sama dengan oosit domba pubertas dalam mencapai tahap MII. Temuan ini sejalan dengan laporan Ledda *et al.* (1999) yaitu oosit dengan diameter sama yang diperoleh

dari domba prapubertas maupun domba yang sudah mengalami pubertas memiliki kemampuan yang sama pada tingkat pembelahan meiosisnya. Martino *et al.* (1995) juga melaporkan kambing prapubertas memiliki tingkat maturasi yang sama dengan kambing pubertas.

Oosit domba prapubertas telah memiliki folikel antral. Hal tersebut disebabkan perkembangan folikel pada domba telah berlangsung pada usia dua minggu dan telah mencapai folikel antral pada usia empat minggu (Berlinguer *et al.*, 2007). Secara umum folikel antral memiliki diameter 2-4 mm pada domba (Evans, 2003), dan dilaporkan folikel domba prapubertas telah mencapai ukuran diameter 4-6 mm (Kochhar *et al.*, 2002). Adapun folikel domba prapubertas maupun folikel domba pubertas yang digunakan dalam penelitian ini merupakan folikel yang memiliki diameter sekitar 2-4 mm. Oosit yang berasal dari folikel antral merupakan oosit yang sedang tumbuh dan cenderung lebih aktif dalam melakukan proses transkripsi dan translasi untuk menghasilkan RNA dan protein yang penting untuk proses perkembangan selanjutnya (Hytell *et al.*, 1997; Torner *et al.*, 2008). Akumulasi lipid dalam sitoplasma oosit sama pentingnya dengan akumulasi protein dan *messenger ribonucleic acid* (mRNA) untuk mendukung perkembangan awal oosit (Sierard *et al.*, 2006). Oosit domba prapubertas maupun domba pubertas dapat memperlihatkan kemampuan yang sama dalam perkembangan maturasinya. Lebih lanjut Anguita *et al.* (2007) melaporkan bahwa ukuran diameter tertentu pada oosit kambing prapubertas mempunyai kompetensi perkembangan yang baik hingga tahap blastosis.

**Tingkat Fertilisasi Oosit**

Oosit yang terfertilisasi dicirikan dengan terbentuknya PN. Pada Tabel 3 disajikan tingkat fertilisasi oosit domba prapubertas nyata

Tabel 3. Status inti oosit domba prapubertas dan pubertas setelah difertilisasi secara *in vitro*.

Kelompok	Total oosit(n)	Pembentukan Pronukleus n (% ± SD)				Total Terfertilisasi
		0 PN	1 PN	2 PN	> 2 PN	
Prapubertas	55	6 (10,9±07,5)	4 (7,3±9,9)	33 (60,0±8,9)	12 (21,8±12,2)	45 (81,8±7,4)
Pubertas	54	3 (05,6±10,1)	5 (9,3±8,8)	42 (77,8±6,3)	4 (07,4±07,6)	46 (85,2±1,3)

Keterangan: <sup>a,b</sup> superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Normal: 2 Pronukleus (PN); Polispermia: membentuk >2 PN.

lebih rendah (60%) dibandingkan dengan oosit domba pubertas (77,7%) ( $P < 0,05$ ). Data ini sejalan dengan yang dilaporkan pada kambing prapubertas (Martino *et al.*, 1995). Meskipun oosit domba prapubertas dan pubertas memiliki kemampuan yang sama dalam tahap pembelahan meiosis yaitu keduanya mampu mencapai tahap MII, namun tingkat fertilisasi yang dihasilkan pada oosit domba prapubertas lebih rendah. Pada penelitian sebelumnya Ledda *et al.* (2001) melaporkan bahwa oosit yang berasal dari ovarium domba prapubertas memiliki tingkat fertilisasi yang rendah disebabkan karena aktivitas MPF yang lebih rendah secara signifikan ketika mencapai tahap MII, sehingga berpengaruh terhadap perkembangan oosit selanjutnya.

Adapun bentuk aktivasi dari MPF kompleks ini dipengaruhi oleh penurunan sintesis cyclin B atau tidak sempurnanya fosforilasi residu *threonin-serine* yang dapat terjadi pada tahap ini. Selain itu aktivitas MAPK juga rendah, penurunan energi metabolisme, minimnya *influx*  $Ca^{2+}$  pada fertilisasi dan penurunan kemampuan hidup pada embrio setelah fertilisasi (Gandolfi *et al.*, 1998; Khatir *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2001; Salamone *et al.*, 2001). Hal inilah yang diduga mengakibatkan rendahnya kualitas oosit domba prapubertas dalam upaya mencapai pembentukan dua PN.

Persentase kejadian polispermi pada oosit domba prapubertas juga cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan oosit domba pubertas ( $P > 0,05$ ) (Tabel 3). Hal tersebut kemungkinan karena oosit domba prapubertas memperlihatkan parameter yang berbeda dari pematangan sitoplasmanya, termasuk tidak meratanya distribusi organel sel yaitu kortikal granula (Gandolfi *et al.*, 2000). Eksositosis dari isi kortikal granula tersebut mengantarkan pada reaksi kortikal yang kemudian diikuti dengan reaksi zona pellusida yang akan menjadi dinding pertahanan melawan polispermi (Slavik *et al.*, 2005). Hytell *et al.* (1997) melaporkan bahwa di antara peristiwa yang lain melalui distribusi kembali organel sel termasuk kortikal granula yang penting untuk menginduksi reaksi kortikal dan reaksi zona. Gandolfi *et al.* (2000) juga menyatakan bahwa perubahan struktural tersebut tertunda dan tidak sempurna pada oosit domba prapubertas sehingga dapat menjadi penyebab kegagalan perubahan pada zona pellusida.

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa oosit domba prapubertas memiliki kemampuan maturasi yang sama dengan oosit domba pubertas namun memiliki kemampuan fertilisasi yang lebih rendah.

## SARAN

Diperlukan pengamatan lebih lanjut pada ultrastruktur oosit domba prapubertas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan dan Perguruan Tinggi yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui program beasiswa pendidikan pascasarjana dalam negeri (BPP-DN) tahun 2013-2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alm H, Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Tuchscherer A. 2006. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology* 65: 1422-1434.
- Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Maria-Teresa P. 2007. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (*cdc2*) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 67: 526-536.
- Armstrong DT. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Berlinguer F, Succu S, Mossa F, Madeddu M, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. 2007. Effects of trehalose co-incubation on *in vitro* matured prepubertal ovine oocyte vitrification. *Cryobiology* 55: 27-34.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Mohamad K, Djuwita I, Sukra Y. 1999. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Proceeding*: 258-263.

- Chohan KR, Hunter AG. 2004. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology* 61: 373-380.
- Cran DG, Moor RM, Hay MF. 1980. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fertil* 59: 125-132.
- De Loos FD, Vliet CV, Maurik PV, Kruip ThAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24: 197-204.
- Evans ACO. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim* 38: 240-246.
- Fair T, Hytell P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42: 437-442.
- Gandolfi F, Milanese E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, Lauria A, Armstrong DT. 1998. Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 49: 168-175.
- Gandolfi F, Vassena R, Lauria A. 2000. The developmental competence of the oocytes before puberty: is something missing? *Reprod Domest Anim* 35: 66-71.
- Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 2<sup>nd</sup> edition. London (GB): CABI Publishing.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. USA (US): Lippincott Williams & Wilkins.
- Hytell P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.
- Izquierdo D, Villamediana P, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on ivf and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49: 1501-1513.
- Kauffold J, Am HA, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj A. 2005. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J Reprod Dev* 51: 325-332.
- Khatir H, Lonergan P, Mermilod P. 1998. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 50: 917-929.
- Kochhar HPS, Wu B, Morris LHA, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA. 2002. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Domest Anim* 37: 19-25.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. 1999. Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39: 503-508.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. 2001. Cell coupling and maturation-promoting factor activity in *in vitro*-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol Reprod* 65: 247-252.
- Lonergan, Sharif PH, Monaghan P, Wahid H, Gallagher M, Gordon I. 1992. The effect of follicle size on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. Cambridge. Proceeding Of Seventh Meeting of The European Embryo Transfer.
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. 1995. *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43: 473-485.
- Miyano T. 2005. *In vitro* growth of mammalian oocytes. *J Reprod Dev* 51: 169-176.
- O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WMC, Evans G. 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* 8: 1029-1037.
- O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WMC, Evans G. 2000. Comparison of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal pigs. *Reprod Domest Anim* 35: 101-107.
- Palma GA, Tortonese DJ, Sinowatz F. 2001. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol* 30: 295-300.

- Pawlak P, Cieslak A, Warzych E, Zejden Z, Strabel-Szumacher M, Glura-Molinska M, Lechniak D. 2012. No single way to explain cytoplasmic maturation of oocytes from prepubertal and cyclic gilts. *Theriogenology* 78: 2020-2030.
- Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, DUBY RT. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod* 64: 1761-1768.
- Shirazi A, Sandeghi N. 2007. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Res* 69: 103-107.
- Sierard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocytes to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- Slavik T, Libik M, Wierzchos E, Fulka J. 2005. An attempt to reduce polyspermic penetration in lamb oocytes. *Folia Biol (Praha)* 51: 34-39.
- Steel RGD, Torrie JH. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta (ID): PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-martinez H. 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl* 23: 13-21.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tornek W, Phatsara C, Alm H, Sirard MA, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D. 2008. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* 135: 197-212.
- Velilla E, Izquierdo D, Rodriguez-Gonzales E, Lopez-Bejar M, Vidal F, Paramio MT. 2004. Distribution of prepubertal and adult goat oocytes cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol Reprod Dev* 68: 507-514.