



**PROSIDING**

**SEMINAR NASIONAL  
BIOTEKNOLOGI IV**

**Universitas Gadjah Mada**

*"Bioteknologi,  
Perubahan,  
dan Masa Depan"*



Sabtu, 29 Oktober 2016  
PS. Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada



Program Studi S2/S3 Bioteknologi  
Sekolah Pascasarjana UGM

## PROSIDING

*Seminar Nasional Bioteknologi IV  
Universitas Gadjah Mada*

BIOTEKNOLOGI, PERUBAHAN, DAN MASA DEPAN

Sekolah Pasca Sarjana UGM, 29 Oktober 2016

### KEYNOTE SPEAKERS

**Prof. Bernhard Grimm**

(Humboldt University Berlin, Germany)

**Prof. Enoch Y. Park**

(Shizuoka University, Japan)

**Prof. Koji Kageyama**

(Gifu University, Japan)

### REVIEWERS

Prof. drh. Widya Asmara, SU, Ph.D

Prof. Dr. Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc.

Ir. Donny Widiyanto, Ph.D

Dr. Rarastoeti Pratiwi, M.Sc

Dr. Yekti Asih Purwestri, M.Si

Dr. M. Saifur Rohman, M. Eng.

Dr. Tri Rini Nuringtyas, M. Sc.

Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

Dr. Woro Anindito Sri Tunjung, M.Sc.

Dr. Ir. Murwantoko, M.Si.

Dr. rer. nat. Andhika Puspito Nugroho, S.Si., M.Si.

Dr. Zuliyati Rohmah, M.Si.

Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

Jl. Teknik Utara, Pongung, Yogyakarta, 55281,

Telp : 0274-564239, 544975, 555881, E-mail : sps@ugm.ac.id

<http://pasca.ugm.ac.id>

**PROSIDING  
SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI IV  
UNIVERSITAS GADJAH MADA**

Tema  
*Bioteknologi, Perubahan, dan Masa Depan*

Sekolah Pasca Sarjana UGM, 29 Oktober 2016

- Keynote Speaker : - Prof. Bernhard Grimm (Humboldt University Berlin, Germany)  
- Prof. Enoch Y. Park (Shizuoka University, Japan)  
- Prof. Koji Kageyama (Gifu University, Japan)
- Reviewer : - Prof. drh. Widya Asmara, SU, Ph.D  
- Prof. Dr. Ir. Siti Subandiyah, M.Agr.Sc.  
- Ir. Donny Widiyanto, Ph.D  
- Dr. Rarastoeti Pratiwi, M.Sc  
- Dr. Yekti Asih Purwestri, M.Si  
- Dr. M. Saifur Rohman, M. Eng.  
- Dr. Tri Rini Nuringtyas, M. Sc.  
- Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.  
- Dr. Woro Anindito Sri Tunjung, M.Sc.  
- Dr. Ir. Murwantoko, M.Si.  
- Dr. rer. nat. Andhika Puspito Nugroho, S.Si., M.Si.  
- Dr. Zuliyati Rohmah, M.Si.
- Editor : - Chahyaning Ardhiani  
- Puput Putri Nurbasari  
- Laurensia Maria Yulian  
- Demas Bayu Handika  
- Firasti Agung N. S.
- Cover Design dan Lay Out : Lintang Pustaka Utama
- Cetakan I : Agustus 2017
- Publisher : Sekolah Pascasarjana UGM
- Alamat : Jl. Teknika Utara, Pogung, Sleman, Yogyakarta 55281
- Email : [sps@ugm.ac.id](mailto:sps@ugm.ac.id); [biotech@ugm.ac.id](mailto:biotech@ugm.ac.id)
- Website : <http://pasca.ugm.ac.id>; [//biotech.ugm.ac.id](http://biotech.ugm.ac.id)

**ISBN: 978-602-8683-20-3**

All right reserved  
No part of this publication may be reproduced without written permission of the publisher

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
KEPANITIAAN .....	ix
SUSUNAN ACARA .....	x
Uji Organoleptik dan Kesukaan Yoghurt Susu Biji Nangka ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> ) dengan Perisa Alami Buah Nangka <i>Annonia MR dan YM Lauda Feroniasanti</i> .....	1
Ketahanan Tanaman Cabai ( <i>Capsicum annum</i> L.) Generasi Tetua (F <sub>1</sub> ) dan Generasi Kelima (F <sub>5</sub> ) terhadap Infeksi <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Aprilia Dita Pawestri, Rina Sri Kasiamdari, Budi Setiadi Daryono</i> .....	12
Viabilitas Bakteri Asam Laktat dan Khamir pada Kefir dengan Metode <i>Spray Drying</i> <i>Ayu Septi Anggraeni, Hendra Herdian, M. Faiz Karimy, Lusty Istiqomah, A. Angger Sakti, Harun Ar Rasyid</i> .....	28
Insidensi dan Prevalensi <i>White Spot Syndrome Virus</i> (WSSV) pada Plankton dari Sentra Budidaya Udang Vaname Supra Intensif di Kabupaten Barru <i>Bunga Rante Tampangallo dan Herlinah</i> .....	41
Analisis Filogenetik pada Sapi Peranakan Angus <i>Dwi Ahmad Priyadi, Yudi Adinata, Tety Hartatik</i> .....	57
Multiplikasi Tunas <i>In Vitro</i> Jeruk Batang Bawah <i>Japansche Citroen</i> (JC) dengan Peningkatan Konsentrasi Vitamin dan Penambahan Sitokinin <i>Dyah Retno Wulandari, Aida Wulansari, Deritha Ellfy Rantau, Tri Muji Ermayanti</i> .....	68

Efek Fermentasi oleh <i>Lactobacillus plantarum</i> terhadap Kandungan Asam Amino Ampas Tahu <i>Eka Fitasari dan Budi Santosa</i> .....	86
Konstruksi Gen <i>cyp71AV1</i> pada Vektor pCAMBIA 1303 dan Transformasi ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Elfahmi, Lely Sulfiani Saula, Tati Kristianti, Sony Suhandono</i> .....	94
Seleksi Benih dengan Seed Gravity Table untuk Meningkatkan Perkecambahan dan Pertumbuhan Bibit Pilang ( <i>Acacia leucophloea</i> ) <i>Eliya Suita</i> .....	108
Pengaruh Waktu Pematangan Oosit Terhadap Keberhasilan Produksi Embrio Sapi Bali Secara <i>In Vitro</i> <i>Herry Sonjaya, Hasbi, Lellah Rahim, Sri Gustina, Muhammad Amin</i> .....	124
Pengaruh Volume Inokulum <i>Zymomonas mobilis</i> pada Produksi Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok Kuning ( <i>Musa paradisiaca</i> L.) dengan Metode Fermentasi Substrat Padat <i>Hisreidi Funome dan Retno Herrani</i> .....	140
Evaluasi Performa Pertumbuhan pada Keturunan Ikan Lele Mutiara Transgenik F1 <i>Ibnu Dwi Buwono</i> .....	150
Kadar Fe dan Zn Beras Padi Lokal Rawa Pasang Surut <i>Izhar Khairullah</i> .....	173
Aktivitas Penghambatan Ekstrak Etanol Rumput Laut <i>Caulerpa</i> sp. Terhadap Jamur <i>Aspergillus flavus</i> pada Biji Jagung <i>Julyasih, KSM. dan Purnawati, A.</i> .....	186

Bacteriological Quality of Milk Cow in Jember Based on the Content of Coliform Bacteria ( <i>Escherichia coli</i> ) <i>Kennis Rozana, Dwi Wahyuni, Mochammad Iqbal</i> .....	194
Teknik Sterilisasi dan Regenerasi In Vitro Eksplan Tunas Rumput Gajah Mini Odot ( <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Mott) <i>Marhamah Nadir, Rinaldi Sjahrir, Budiman</i> .....	208
Isolasi dan Seleksi Bakteri Resisten Tembaga dari Tailing PT Freeport Indonesia (PTFI) <i>Maria Massora, Erni Martani, Eko Sugiharto, Roberth Sarwom, Tumpal Sinaga</i> .....	217
Identifikasi dan Teknik Pengendalian Hama dan Penyakit Benih Kayu Bawang ( <i>Azadirachta excelsa</i> (Jack) Jacobs) pada Benih Pasca Panen dan Perkecambahan <i>Naning Yuniarti, Tati Suharti, Nurhasybi</i> .....	232
Efek Protektif Jus Campuran Buah Tropis terhadap Kualitas Sperma Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar Asap Rokok <i>Novi Febrianti, Irfan Yuniyanto, Haris Setiawan, Ulfiana Zahrotun Naafi'ah</i> .....	244
Penggunaan <i>Plant Preservative Mixture</i> (PPM) untuk Sterilisasi Eksplan dan Media pada Kultur <i>In Vitro</i> <i>Novi Syatria dan Jhon Firison</i> .....	257
Karakter Reduksi Sulfat dan Pengendapan Logam Mn Konsorsium Bakteri Pereduksi Sulfat dari Kotoran Kambing <i>Nur'Aini Purnamaningsih dan Endah Retnaningrum</i> .....	273
Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Terhadap Total Asam Titrasi, pH dan Karakteristik Tempoyak Menggunakan Starter Basah <i>Lactobacillus casei</i> <i>Oktaviani P. Megama dan Puspita Ratna Susilawati</i> .....	282

<i>Eucalyptus pellita</i> germplasm conservation by <i>in-vitro</i> cold storage <i>Reny Hayati Zul, Suharyanto, Irda Susanti, Gustavo Lopez ..</i>	298
Transformasi Genetik pada Tanaman Tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> ) dengan Perantara <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Strain GV3101 yang Membawa Gen Pelapor GUS <i>Rika Mustika dan Erly Marwani .....</i>	308
Efektivitas Konsentrasi dan Lama Ko-Kultivasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 (pEKB-WD) Pembawa Gen Defensin Wasabi Terhadap Pengkalusan Eksplan Daun pada Pengembangan Krisan Tahan Penyakit Secara <i>In Vitro</i> <i>Rinaldi Sjahril, Feranita Haring, Muh. Riadi, Arjunayanti Amir, Trisnawaty, A.R. ....</i>	322
Preparation of a New DNA Calibrator for HER-2 Scoring Application and Its PCR Test Specificity <i>Rismaya, Bugi Ratno Budiarto, Desriani.....</i>	336
Radio - Sensitivity Callus Inpara 3 Varieties Based On The Growth And Regeneration Of Callus <i>Rossa Yunita, Nurul Khumaida, Didy Sopandie, Ika Mariska</i>	350
Pertumbuhan Tunas <i>in vitro</i> dan Pembentukan Umbi Mikro Kentang Merah ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) dengan Modifikasi Unsur Hara Makro dan Peningkatan Konsentrasi Gula <i>Rudiyanto, Betalini Widhi Hapsari, Tri Muji Ermayanti ..</i>	360
Phylogenetic Analysis of <i>Salmonella spp</i> Isolate based on <i>invA</i> Gene Sequence <i>Stefanus Paulus dan Charis Amarantini .....</i>	378
Proliferasi dan Regenerasi Kalus Hasil Transformasi Gen <i>cryIAC</i> dari Tiga Varietas Padi Indica Untuk Pembentukan Transgenik Padi Tahan Penggerek Batang <i>Suci Rahayu, Sri Koerniati, Ika Mariska.....</i>	389

Biodegradasi <i>Remazol Brilliant Blue</i> dalam Biosystem Vertikal <i>Suyasa, W.B., N.Wirajana, G.A.D.A. Suastuti</i> .....	406
Manganese (Mn) Stress toward Hyperaccumulators Plants Combination (HPC) Using <i>Jatropha curcas</i> and Lamtoro Gung ( <i>L. leucocephala</i> ) In Mychorrizal Addition on soybean ( <i>Glycine max</i> ) Seedling Stage <i>Tania Sylviana Darmawan, Sri Nurhatika, Anton Muhibuddin, Dyah Agustina, Achmad Arifiyanto</i> .....	420
Efektifitas Enzim Pemecah Polisakarida dalam Makro-Alga <i>Ulva lactuca</i> <i>Tri Poespowati, Ali Mahmudi, Rini Kartika Dewi</i> .....	436
Total Asam Laktat, Protein, Lemak, Karbohidrat, dan Serat <i>Whey Kefir</i> Susu Sapi Berdasarkan Konsentrasi Starter dan Waktu Fermentasi <i>Tuti Kurniati, Neneng Windayani, Milla Listiawati</i> .....	449
Gambaran Histologi Neuron Dopaminergik Substansia Nigra Pars Kompakta Tikus Putih Setelah Induksi Parakuat Diklorida Sebagai Hewan Model Penyakit Parkinson <i>Yosua Kristian Adi, Tri Wahyu Pangestiningasih, Hery Wijayanto, Trini Susmiati, Ginus Partadiredja</i> .....	465
Karakterisasi Benih Tembesu ( <i>Fagrea fragans</i> ) dari Tiga Puluh Tiga Pohon Induk Asal Sumatera Selatan <i>Yulianti Bramasto, Kurniawati P.Putri, Agus Sofyan</i> .....	473
Impact Of Water Pollution In The Quality Of Catfish ( <i>Pangasius sp.</i> ) Spermatozoa <i>Wahyu Herlambang, Jamilatul Arofah, Ambarwati N. Cholifah, Fajriyatun Nufus, Yuli Winarsih, Khusnita Giarti, Wiji A. Suciati, M. Hilman F. A., Alfiah Hayati</i> .....	489



SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI IV  
UNIVERSITAS GADJAH MADA

## KEPANITIAAN

- Pengarah : Prof. dr. Iwan Dwiprahasto, M.Med.Sc., Ph.D
- Penanggungjawab : Prof. Ir. Suryo Purwono, MA.Sc., Ph.D
- Ketua Panitia : Dr. Chusnul Hanim, M.Si.
- Sekretaris : Dr. Rarastoeti Pratiwi, M.Sc  
Cahyaning Ardhiani, S.P.  
Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si.  
Bernadia Branitamahisi, S.Si.  
Ikhsan Fauzi Wiryawan, S.Si
- Bendahara : Joko Budisantoso, S.Psi
- Seksi Ilmiah : Dr. Yekti Asih Purwestri, M.Si  
Dr. Tri Rini Nuringtyas, M.Sc  
Dr. M. Saifur Rohman, M. Eng.  
Puput Putri Nurbasari, S.P.  
Ari Surya Sukarno, S.Pt.  
Demas Bayu Handika, S.Pi.  
Laurensia Maria Yulian D.D., S.Pt.  
Firasti Agung N. S., S.Farm., Apt.
- Seksi Acara : Annisa Nazera Fauzia, S.Si.  
Dini Astika Sari, S.Si.  
Venny Kurnia Andika  
M. Fahmy Avicenna  
Joni Kristanto  
Ifhan Dwinhoven  
Paryono, S.E., M.P.A.
- Seksi Publikasi dan Dokumentasi:  
Nasrulloh Harino A.G, S.Si  
Masreza Parahadi  
Santosa Pradana Putra S. N.  
Stefani Santi Widhiastuti  
Angga Dwi Prasetyo
- Seksi Konsumsi : Arsiyah  
Tri Purwanti  
Siti Rochani, S.E.
- Seksi Perlengkapan : Kaselan  
Tukijo  
Tony Ruwaedi, S.IP  
Sujono  
Istarto

## Pengaruh Waktu Pematangan Oosit Terhadap Keberhasilan Produksi Embrio Sapi Bali Secara *In Vitro*

Herry Sonjaya\*<sup>1</sup>, Hasbi<sup>1</sup>, Lellah Rahim<sup>1</sup>, Sri Gustina<sup>2</sup>, Muhammad Amin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Staf Pengajar Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10 Makassar 90245

<sup>2</sup> Staf Pengajar Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Sulawesi Barat, Jl. Prof. Dr. Baharuddin Lopa, SH. Lutang, Majene 91412

<sup>3</sup> Mahasiswa Ilmu dan Teknologi Peternakan Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10 Makassar 90245

E-Mail:\* sonjayaherry@gmail.com ; Phone/Fax: 08124290189/0411-58706

### Intisari

Lamanya proses pematangan oosit sapi Bali secara *in vitro* untuk mencapai ovum yang siap dibuahi belum diketahui. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah mengetahui tingkat maturasi oosit, tingkat fertilisasi, dan keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* dengan lama waktu maturasi oosit sapi Bali yang berbeda. Kegiatan penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap, yaitu Koleksi ovarium, Koleksi oosit dengan metode *slicing*, maturasi Oosit dengan medium TCM 199 (GIBCO™) + 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO™)+hormon PMSG (20 µl)+hCG (20µg/ml)+4 µl gentamycin. Perlakuan maturasi oosit secara *in-vitro* terdiri atas: 24, 26, 28 dan 30 jam dalam incubator pada suhu 38,5°C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Tahap selanjutnya adalah pemeriksaan tingkat pematangan inti (penentuan GV, GVBD, MI dan MII). Pemeriksaan tingkat pematangan inti juga dilakukan dengan pewarnaan oosit untuk memudahkan pengamatan. Selanjutnya oosit yang matang difertilisasi dengan sperma yang telah dikapasitasi. Pada tahap terakhir, dilakukan kultur *in-vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat pematangan oosit yang mencapai tahap MI nyata ( $P < 0.05$ ) lebih rendah pada waktu maturasi

28 jam dibanding waktu maturasi 24 jam (24.07%); 26 jam (19.93%) dan 30 jam (21.37%). Pematangan inti yang mencapai tahap MII nyata tertinggi ( $P < 0.05$ ) dicapai pada waktu maturasi 28 jam (91.53%) dibanding dengan waktu maturasi 24 jam (75.93%), 26 jam (80.07%) dan 30 jam (78.63%). Tingkat fertilisasi nyata ( $P < 0.05$ ) tertinggi pada waktu maturasi 28 jam (70.03%) dibanding dengan waktu maturasi 24 jam (55.54%), 26 jam (59.73%) dan 30 jam (64.21%). Penelitian ini menyimpulkan bahwa waktu maturasi yang optimal untuk tingkat pematangan oosit dan keberhasilan fertilisasi secara fisik adalah 28 jam dan tahap pembelahan sel embrio adalah 32 sel.

**Kata Kunci:** Pematangan Oosit, Produksi Embrio In-vitro, Sapi Bali

### **Pendahuluan**

Pematangan oosit secara in-vitro merupakan tahap awal dari proses fertilisasi secara in-vitro yang selanjutnya digunakan untuk produksi embrio secara in-vitro. Kualitas oosit hasil pematangan secara in-vitro sangat menentukan keberhasilan fertilisasi dan kultur embrio. Lamanya waktu maturasi in vitro dapat mempengaruhi status meiotik dan kualitas oosit yang dihasilkan melalui proses pematangan oosit secara invitro. Riset mengenai waktu yang dibutuhkan oleh oosit sapi untuk mencapai maturasi inti telah banyak dilakukan pada berbagai spesies ternak sapi dan waktu yang diperlukan untuk mencapai tahap metafase dua sangat beragam. Gliedt *et al.* (1996) melaporkan bahwa waktu maturasi oosit sapi potong yaitu 24-28 jam, sapi perah fries holand yaitu 24,30 dan 36 jam (Triwulanningsih dkk., 2001) dan 20-24 jam untuk sapi peranakan ongole (Kusindarta, 2009). Namun demikian untuk sapi Bali, informasi mengenai maturasi untuk mencapai tahap metafase dua saat ini masih terbatas. Oleh karena itu, waktu maturasi yang tepat sangat diperlukan untuk menemukan kondisi optimal dalam mendukung keberhasilan perkembangan embrio selanjutnya.

Maturasi oosit meliputi maturasi inti dan maturasi sitoplasma. Selama maturasi oosit, struktur kromatin dalam oosit immatur melewati suatu proses penyusunan morfologi yang dimulai pada profase pembelahan meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase dua. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui dampak waktu maturasi oosit terhadap tingkat maturasi oosit, tingkat fertilisasi, dan keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* pada oosit sapi Bali.

### **Metodologi**

#### ***Tempat Penelitian***

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2014 – Mei 2015, bertempat di Laboratorium Fertilisasi dan Produksi Embrio Ternak, Laboratorium Terpadu Pusat Kegiatan Penelitian (PKP), Universitas Hasanuddin, Makassar.

#### ***Alat dan Bahan***

Alat yang digunakan adalah *syringe*, kaca arloji, *petri dish*, inkubator CO<sub>2</sub> 5%, pipet, mikropipet, cawan petri, objek glass, cover glass, gunting bedah, scalpel, gelas ukur, pinset, oven, labu ukur 1 liter dan 500 ml, autoclaf dan mikroskop Axio Cam. Bahan yang digunakan adalah ovarium sapi Bali sebanyak 10-12 pasang yang diperoleh dari RPH Tamangapa, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Oosit diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak.

#### ***Metode***

Parameter pada penelitian ini adalah tingkat pematangan oosit yang dimaturasi *in vitro*. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan dalam penelitian ini adalah waktu maturasi *in vitro* yang berbeda. Dengan level waktu maturasi *in vitro* yaitu T1 = 24 jam; T2 = 26 jam; T3 = 28 jam dan T4 = 30 jam.

### **Prosedur**

Koleksi oosit dilakukan dengan menyayat/mencacah (*slicing*) folikel yang ada di permukaan ovarium sehingga cairan folikel keluar. Selanjutnya dilakukan pembilasan (*flushing*) dengan penyemprotan NaCl 0,9% menggunakan *syringe* ke dalam folikel bekas sayatan, agar oosit dapat keluar. Selanjutnya oosit diseleksi menggunakan mikroskop (hanya oosit dengan keadaan sitoplasma yang homogen dan dikelilingi  $\geq 3$  lapis sel kumulus yang digunakan) dan ditampung dalam *petri dish* yang berisi media *phosphate buffered saline* yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* 10%. Oosit hasil koleksi dicuci dalam medium koleksi yang terdiri atas PBS ditambah 10% FBS. Selanjutnya oosit yang diperoleh dibagi dalam 4 kamar perlakuan untuk diberikan waktu maturasi yang berbeda-beda (24, 26, 28 dan 30 jam) (Sobari dkk., 2012).

Evaluasi tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan meiosis dari tahap *germinal vesicle* (GV) ke tahap metaphase II yang dapat dilakukan dengan pewarnaan 2% *aceto orcein*. *Germinal vesicle* ditandai dengan membran inti dan nukleus yang tampak dengan jelas, *germinal vesicle breakdown* (GPBD) ditandai dengan pecahnya membran inti dan inti sudah tidak terlihat dengan jelas, metaphase I (MI) ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang equator, anafase I (AI) ditandai dengan perpindahan kromosom ke arah kutub, telofase I (TI) ditandai dengan kromosom telah mencapai dua daerah kutub serta MII ditandai dengan adanya polar bodi I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap MI (Romar and Funahashi, 2006; Shirazi and Sadeghi, 2007). Tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII (Romar and Funahashi, 2006; Shirazi and Sadeghi, 2007).

Oosit yang telah dimaturasi dibersihkan dari sel-sel kumulusnya (*denudase*) dengan bantuan enzim *hyaluronidase*

(Sigma, USA) 0,25% dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter yang sesuai dengan ukuran oosit. Oosit diletakkan pada *drop*KCl 0.7% diatas kaca objek, lalu difiksasi dengan kaca penutup yang memiliki bantalan parafin dan vaselin (1:9) pada keempat sudutnya. Preparat oosit yang telah jadi, difiksasi pada *ethanol* dan asam asetat dengan perbandingan (3:1) selama 3-4 hari pada temperatur kamar. Setelah difiksasi preparat direndam terlebih dahulu dalam larutan *ethanol absolute* selama satu jam. Sebelum oosit diwarnai, preparat dikeringkan menggunakan *tissue*. Lalu oosit diwarnai dengan *aceto orcein* 2% selama 5 menit. Kemudian zat pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi kaca penutup diberi larutan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan dibawah mikroskop fase kontras (Yadav *et al.*, 2008).

#### **Analisis data**

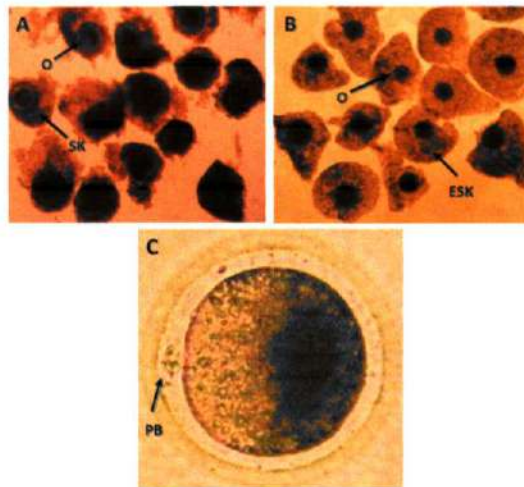
Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *one-way* ANOVA, diikuti dengan analisis lanjutan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) menggunakan SPSS-16.0 (Gaspersz, 1991).

#### **Hasil dan Pembahasan**

Pada penelitian ini, oosit yang digunakan diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak (Gambar 1A), sehingga oosit yang digunakan, diupayakan seragam dan mempunyai kompetensi perkembangan yang sama. Oosit yang telah dimaturasi mengalami perubahan pada sel kumulusnya (Gambar 1B). Untuk memudahkan pengamatan oosit didenudase (Gambar 1C), sehingga semakin jelas terlihat terbentuknya polar body yang menandakan kematangannya (mencapai metaphase II).

Tingkat pematangan oosit pada beberapa tahap perkembangan disajikan pada Gambar 2. GV dikarakterisasi

dengan kehadiran nukleus bulat dengan selaput utuh dan sebuah kromatin berfilamen (Gambar 2A). GVBD ditandai dengan kromatin kental dan tidak adanya membran inti terlihat (Gambar 2B). Metafase I ditandai dengan kehadiran kromosom yang berjajar pada bidang equator, membran inti sudah tidak tampak lagi (Gambar 2C). Metafase II ditandai dengan kehadiran kromosom yang berjajar pada bidang equator dan terbentuk *first polar body* (Gambar 2D).

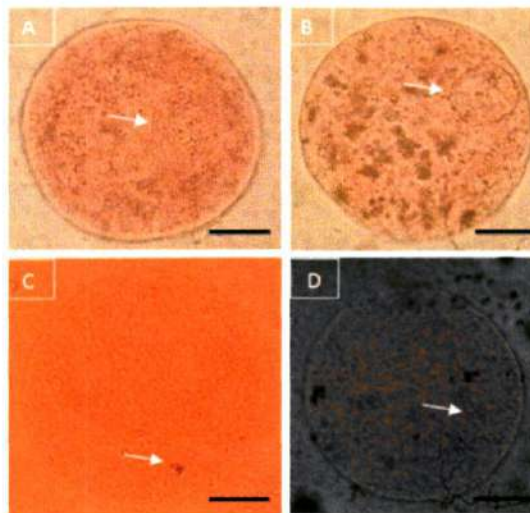


Gambar 1. Kondisi Oosit sebelum maturasi (A); setelah maturasi (B) dan kondisi oosit termaturasi yang telah didenudasi (C).Keterangan : O=oosit, SK=Sel Kumulus, ESK=Ekspansi Sel Kumulus, PB=Polar Bodi.Pembesaran 400x.

Oosit memerlukan dua hal dalam mendukung keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio, yaitu terjadinya pematangan inti dan sitoplasma (Kishida, dkk., 2004). Pematangan inti meliputi berbagai perubahan kronologis tahapan meiosis, sedangkan pematangan sitoplasma merupakan penambahan kompetensi biologis oosit yang meliputi berbagai perubahan struktur dan biokimiawi di dalam sitoplasma yang memungkinkan

oosit untuk mengekspresikan potensi kemampuan perkembangannya setelah fertilisasi serta pembentukan dan perkembangan embrio (Gordon 2003; Watson 2007). Tahapan pematangan inti dan sitoplasma oosit sapi Bali yang dimaturasi dengan waktu yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 2. Oosit pada status inti metafase II dikatakan sebagai oosit yang telah matang dan siap untuk difertilisasi, hal ini sesuai dengan pendapat Yadav, dkk., (1997) dan Gordon (2003) bahwa metaphase II ditandai dengan kromosom yang berjajar pada bidang equator dan terbentuk *first polar body*. Lebih lanjut oleh Gordon (2003) bahwa kondisi metafase II jika pada keadaan *in vivo* terkait dengan ovum yang telah diovulasikan (Gordon 2003). Pematangan inti dapat dievaluasi dengan pewarnaan seperti *aceto orcein* (Lequarre, dkk., 2005), sedangkan pematangan sitoplasma dapat diketahui secara tidak langsung dari terbentuknya pronukleus dan terjadinya pembelahan sel (Ducibella, dkk., 2002).

Pada hewan kuda, sapi, domba dan tikus, sel-sel kumulus memiliki sekitar 43 protein penghubung. Sel-sel cumulus berperan penting dalam proses pematangan oosit secara *in vitro* (Setiadi, 2002), yang selanjutnya akan mempengaruhi kualitas embrio yang dihasilkan. Apabila sel-sel kumulus dilepaskan sebelum pematangan, maka akan memperlambat proses pematangan oosit atau bahkan tidak terjadi pematangan. Kehadiran sel-sel kumulus sangat berperan penting dalam proses transkripsi dan sintesis protein sebelum terjadinya *germinal vesicle break down* (GVBD) oosit domba dan sapi (Trounson, 1992) dan sebagai suplai nutrisi, substrat energi, molekul pembawa pesan untuk perkembangan oosit dan untuk mediasi efek hormon pada *cumulus oocyte complexes* (COCs) (Rahman dkk., 2008).



Gambar 2. Tingkat Pematangan Inti Oosit. A. Germinal vesicle (GV); B. Germinal vesicle breakdown (GVBD); (C) Metafase I (MI); (D) Metafase II (MII). Bar = 30  $\mu$ m.

Maturasi oosit merupakan proses perubahan kompleks pada fosforilasi protein yang mentransformasikan oosit primer menjadi oosit sekunder yang matang (Tomek, dkk., 2002). Perubahan morfologi Oosit meliputi Persentase tingkat pematangan oosit sapi bali dengan waktu maturasi yang berbeda disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa maturasi selama 24 – 30 jam menyebabkan stadium GV dan GVBD semuanya telah menjadi stadium MI dan MII, meskipun laju perubahannya berbeda-beda setiap stadium. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan waktu maturasi yang berbeda (24, 26, 28 dan 30 jam) berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) pada persentase MI dan MII (Tabel 1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat pematangan oosit yang mencapai tahap MI nyata ( $P < 0.05$ ) terendah pada waktu maturasi 28 jam (8.47%) dibanding waktu maturasi 24 jam (24.07%), 26 jam (19.93%) dan 30 jam (21.37%). Pematangan

inti yang mencapai tahap MII nyata tertinggi ( $P < 0.05$ ) dicapai pada waktu maturasi 28 jam (91,53%) dibanding dengan waktu maturasi 24 jam (75.93%), 26 jam (80.07%) dan 30 jam (78.63%).

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit sapi bali dengan waktu maturasi yang berbeda germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metafase I (MI), dan Metafase II (MII).

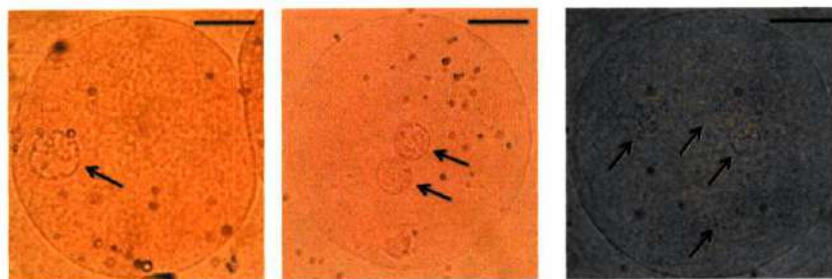
Waktu Maturasi (jam)	Jumlah Oosit	Tingkat pematangan inti (%)			
		GV	GVBD	MI	MII
24	50	-	-	24.07±6.45 <sup>a</sup>	75.93±6.45 <sup>a</sup>
26	50	-	-	19.93±1.15 <sup>a</sup>	<b>80.07±1.15<sup>a</sup></b>
28	48	-	-	8.47 ± 0.56 <sup>b</sup>	<b>91.53±0.56<sup>b</sup></b>
30	43	-	-	21.37±8.14 <sup>a</sup>	78.63±8.14 <sup>a</sup>

Keterangan : GV = *germinal vesicle*; GVBD = *germinal vesicle breakdown*; MI = metaphase I; MII = Metafase II. Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan data berbeda nyata ( $P < 0.05$ ).

Hal ini dapat terjadi karena pada waktu maturasi 28 jam, telah terjadi pematangan oosit yang sempurna. Waktu maturasi 30 jam terlihat terjadi penurunan persentase oosit yang mencapai tahap MII, hal ini dapat diakibatkan kejenuhan oosit akibat proses pematangan yang berlebihan. Hal ini sejalan dengan penelitian Triwulanningsih, dkk., (2001) yang melihat waktu maturasi yang tepat untuk oosit sapi Fries Holand, Triwulanningsih mengemukakan bahwa produksi embrio in vitro dapat dilaksanakan dengan menggunakan waktu maturasi lebih dari 24 jam. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Gasparrini (2007), bahwa maturasi in vitro memegang peran yang sangat penting terhadap inkubasi oosit dengan sperma selama fertilisasi in vitro. Waktu maturasi yang tidak tepat dapat menyebabkan pematangan kromatin yang abnormal, penuaan oosit dan kompetensi pertumbuhan menurun. Oosit memerlukan

dua hal dalam mendukung keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio, yaitu terjadinya pematangan inti dan sitoplasma (Kishida *et al.*, 2004). Pematangan inti meliputi berbagai perubahan kronologis tahapan meiosis, sedangkan pematangan sitoplasma merupakan penambahan kompetensi biologis oosit yang meliputi berbagai perubahan struktur dan biokimiawi di dalam sitoplasma yang memungkinkan oosit untuk mengekspresikan potensi kemampuan perkembangannya setelah fertilisasi serta pembentukan dan perkembangan embrio (Gordon, 2003; Watson, 2007). Maturasi oosit merupakan proses perubahan kompleks pada fosforilasi protein yang mentransformasikan oosit primer menjadi oosit sekunder yang matang (Tomek dkk., 2002). Waktu maturasi 28 jam memberikan tingkat pematangan oosit yang tertinggi karena oosit pada kondisi ini telah mengalami pematangan oosit yang sempurna. Waktu maturasi 30 jam terlihat terjadi penurunan persentase oosit yang mencapai tahap MII, hal ini dapat diakibatkan kejenuhan oosit akibat proses pematangan yang berlebihan

Tingkat fertilisasi oosit dapat diketahui dengan melihat adanya pembentukan pronukleus (Gambar 3). Persentase oosit yang terfertilisasi setelah dimaturasi dengan waktu maturasi yang berbeda disajikan pada Tabel 3.



Gambar 3. Pembentukan pronukleus (PN) setelah fertilisasi. Pronukleus ditunjukkan oleh tanda panah. A. 1 PN; B. 2 PN; C. >2PN. Bar = 30  $\mu$ m.

Fusi antara oosit dan spermatozoa menyebabkan terjadinya pembengkakan inti spermatozoa yang kemudian menjadi pronukleus jantan, sedangkan inti oosit yang dalam keadaan membelah meiosisakan menjadi pronukleus betina, masing-masing dengan kromosom yang haploid. Proses selanjutnya adalah sintesis DNA yang terjadi pada pronukleus jantan dan betina, pronukleus jantan dan betinakemudian bergerak saling mendekati sampai terjadi fusi. Selama proses fusi ini berlangsung selubung inti akan berintegrasi sampai terjadinya proses pembelahan mitosis yang pertama (cleavage) membentuk 2 sel. Kondisi fusi dan pembelahan pertama ini akan berlangsung pada temperatur medium yang dipertahankan pada 30-40°C dan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Temperatur inkubator yang tidak stabil akan mempengaruhi fertilisasi in vitro (Leese *et al.*, 1999).

Oosit yang telah terfertilisasi dicirikan dengan terbentuknya 2 atau lebih pronukleus. Jumlah pronukleus dan tingkat fertilisasi yang terbentuk pada oosit sapi dengan waktu maturasi yang berbeda diperlihatkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah pronukleus dan tingkat fertilisasi yang terbentuk pada oosit sapi dengan waktu maturasi yang berbeda.

Waktu Maturasi	Total Oosit	Pembentukan Pronukleus				Tingkat Fertilisasi (%)
		0 PN (%)	1 PN (%)	2 PN (%)	>2 PN (%)	
24 jam	56	8 (14.29)	17 (30.36)	26 (46.42)	5 (8.93)	31 (55.54) <sup>a</sup>
26 jam	49	2 (4.08)	18 (36.73)	27 (55.10)	2 (4.08)	29 (59.73) <sup>a</sup>
28 jam	50	6 (12.00)	9 (18.00)	34 (68.00)	1 (2.00)	35 (70.03) <sup>b</sup>
30 jam	51	11(21.57)	7 (13.73)	30 (58.82)	5 (9.80)	33 (64.21) <sup>ab</sup>

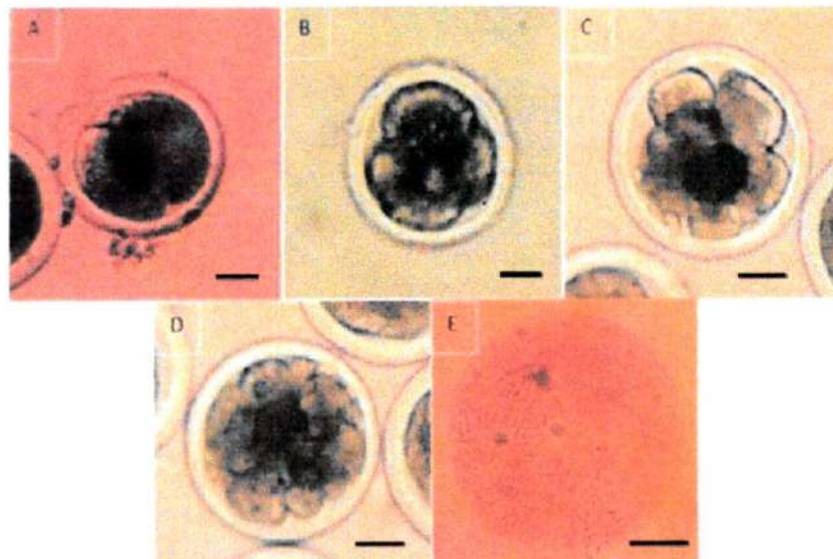
Keterangan : PN = Pronukleus. Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.05).

Tabel 2 memperlihatkan bahwa tingkat fertilisasi tertinggi dicapai dengan waktu maturasi oosit selama 28



jam. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa waktu maturasi yang berbeda berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap tingkat fertilitas *in vitro* oosit. Perbedaan persentase fertilitas berbeda sangat nyata ( $P < 0.05$ ) antara oosit yang dimaturasi selama 24 dengan 28 jam, 26 dengan 28 jam. Namun, tidak terlihat perbedaan yang nyata antara oosit yang dimaturasi selama 28 jam dengan 30 jam. Secara deskriptif terlihat bahwa oosit yang dimaturasi selama 28 jam memberikan persentase tingkat fertilitas yang tertinggi (70.03%) dibandingkan yang lainnya, walaupun tidak berbeda nyata dengan 30 jam (64.21%). Persentase fertilisasi terkecil diperoleh pada waktu maturasi 24 jam yaitu 55.54%. Hasil penelitian ini serupa dengan hasil penelitian Kusindarta (2009) yang menggunakan waktu maturasi *in vitro* 24 jam pada oosit sapi ongkol memperlihatkan keberhasilan fertilisasi sebesar 51,88+3,64%. Fertilisasi merupakan sebuah proses dengan konsumsi energi yang tinggi sehingga kondisi optimum sejak saat termaturasi akan sangat membantu proses penyerapan energi pada tahapan fertilisasi. Hal ini memperlihatkan bahwa waktu maturasi sangat berperan terhadap keberhasilan maturasi. Hal didukung oleh pendapat Gasparrini (2007), bahwa maturasi *in vitro* memegang peran yang sangat penting terhadap inkubasi oosit dengan sperma selama fertilisasi *in vitro*. Nukleus dan sitoplasma oosit mengalami perubahan selama maturasi sehingga waktu maturasi *in vitro* memegang peran yang sangat penting terhadap inkubasi oosit dengan sperma selama fertilisasi *in vitro*.

Tingkat perkembangan rmbrio sapi Bali disajikan pada gambar 3, memperlihatkan perkembangan embrio sapi Bali mulai dari 2 sampai 32 sel, namun hanya dalam jumlah kecil dan setelah mencapai stadium tersebut embrio yang mencapai stadium tersebut tidak mengalami perkembangan.



Gambar 3. Perkembangan embrio sapi Bali (setelah difiksasi); A: Stadium 2 sel, B: Stadium 4 sel, C: Stadium 8 sel, D: Stadium 32 sel, E: Stadium 32 sel. Bar = 30  $\mu$ m.

Rendahnya tingkat perkembangan embrio yang hanya mencapai 32 sel mungkin disebabkan adanya blokir pada stadium 8 sel (Kato dan Iritani, 1993; Gordon 1994) yang memberikan petunjuk adanya transisi kontrol dari induk ke embrio. Secara *in-vivo* sel-sel oviduk mensintesis dan mensekresikan komponen-komponen yang diperlukan untuk perkembangan awal embrio dan faktor-faktor pertumbuhan. Protein tersebut akan berikatan dengan zona pelucida dan selanjutnya menyatu dengan dengan sitoplasma embrio. Protein dan m-RNA yang tersimpan dalam embrio tersebut penting untuk proses transkripsi yang terjadi selama stadium 4 sel sampai akhir stadium 8 sel awal. Apabila terjadi kegagalan proses transkripsi, maka pembelahan embrio akan terhenti atau terjadi blok pada proses pembelahan. Faktor lain adalah ketersediaan

nutrisi selama proses kultur, setiap stadium embrio mempunyai kemampuan untuk memanfaatkan sumber energi yang berbeda-beda sehingga nutrisi dalam medium harus sesuai dengan perkembangan embrio. McLaren (1982) mengemukakan bahwa perkembangan embrio tergantung pada energi yang disediakan terus menerus oleh lingkungan mikronya. Embrio satu sel memerlukan piruvat dan oksaloasetat. Embrio dua sel dapat memanfaatkan fosfopiruvat dan laktat, dan setelah mencapai delapan sel telah mampu memanfaatkan glukosa.

### **Kesimpulan**

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan bahwa waktu maturasi yang optimal untuk tingkat pematangan oosit (mencapai tahap MII) adalah 28 jam (91.53% mencapai tahap MII).

### **Ucapan Terima Kasih**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ketua LP2M-UNHAS yang telah memberikan dana riset Unggulan PT-BOPTN untuk melaksanakan penelitian ini. Ucapan yang sama disampaikan kepada Ketua Laboratorium Terpadu UNHAS yang telah membeikan izin melaksanakan riset di Laboratorium Fertilisasi dan Produksi Embrio In-Vitro. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Ridwan dan Dg. Nompo staff Rumah Potong Hewan yang telah membantu pengambilan sampel sampel penelitian .

### **Daftar Pustaka**

- Ducibella T.*et al.* (2002). Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to  $Ca^{2+}$  oscillation number. *DevBiol* 250:280-291.
- Gasparrini B. (2007). In vitro embryo. *Ital J Anim Sci* 6(2): 92-01.

- Gaspersz V. (1991). *Metode Perancangan Percobaan untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, dan Biologi*. Armico, Bandung.
- Gliedt DW., Rosenkrans CF, Rorie RW., and Rakes JM. (1996). Effect of oocyte maturation length, sperm capacitation time and heparin on bovine embryo development. *J. Dairy Sci.* 79:532-535.
- Goto K., Yasuzuki T., Watani F., and Shiniciro T. (1995). In vitro Development of Bovine Oocytes Collected Ovaries of Individual Cows After Fertilization. *Animal Reproduction Science* 36:110-113.
- Gordon I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. Dublin: CAB International. pp 30-142; 277-290.
- Kishida R., Lee ES., and Fukui Y (2004). In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2004;62:1663-1676.
- Kusindarta DW. (2009). Pengaruh Lama Maturasi dan Lama Inkubasi Fertilisasi Terhadap Angka Fertilitas Oosit Sapi Peranakan Ongole Scara In Vitro. *J.Ked. Hewan* 3(1): 185-193.
- Lequarre S.A.*et al.* (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristic and embryo development in the bovine. *Theriology* 63: 841-859.
- Rahman ANMA., Abdullah RB., and Wan Khadijah WE. (2008). In Vitro Maturation of Oocytes with Special Reference to Goat : A Review. *Biotechnology* 7(4): 599-611.
- Romar R and Funahasi H. (2006). In vitro maturation and fertilization of pocine oocytes after 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B kinas. *Anim Reprod Sci.* 92:321-333.
- Setiadi MA. (2002). Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes in vitro. *REprotech* 1(2) : 87-91.



- Shirazi and Sadeghi N. (2007). The effect of ovine oocytes diameter on nuclear maturation. *Small Rum Res.* 69:103-107.
- Sobari I., Trilaksana IG., dan Suatha IK. (2012). Perbedaan Aktivitas Sapi Bali Kanan dan Kiri serta Morfologi Oosit yang Dikoleksi Menggunakan Metode *Slicing*. *Indonesian Medicus Veterinus* 1(1) : 1-11. ISSN : 2301-7848.
- Tomek W., Melo Strrza FA., and Kubelka M. (2002). Regulation of translation. *Biol Reprod* 66: 1274-82. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.5.127>
- Triwulanningsih E., Toelihere MR., Rutledge JJ., Yusuf TL., Purwantara B., dan Dwiyanto K. (2001). Produksi Embrio In Vitro dengan Modifikasi Waktu dan Hormon Gonadotropin Sealama Pematangan Oosit. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(3): 171-177.
- Trounson AO. (1992). The production of ruminant embryos in vitro. *Anim Reprod Sci* 28:125-137.
- Watson AJ. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation : A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci* 85: E1-E3.
- Yadav RC., Sharma A., Garg N., and Purohit GN. (2008). Survival of vitrified water buffalo cumulus-oocytescomplexes and their subsequent development in vitro. *Bulg J Vet Med.* 11(1):55-64.