

Ketahanan Pangan
251/Kedokteran Hewan

LAPORAN AKHIR TAHUN 2018
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



Efektivitas *Insulin Transferrin Selenium* dan Bovine Serum Albumin Pada Medium Kultur *In vitro* Terhadap Apoptosis Sel Tropoblas, Jumlah Blastosis dan Keberhasilan Transfer Embrio

Tahun Ke II dari Rencana 2 Tahun

Oleh:

Dr. Widjiati MSi., Drh NIDN 0015046204)
Dr. Epy Muhammad Luqman, Msi., drh NIDN 0013126703
Dr. Benjamin Christoffel Tehuparing, Msi., drh. NIDN 0015015505

DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGAMBIAAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI SESUAI
DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN SESUAI DENGAN
PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

LAPORAN AKHIR TAHUN 2018
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



KK
KK
LP.49/19
Wid
e

Efektivitas *Insulin Transferrin Selenium* dan Bovine Serum Albumin Pada Medium Kultur *In vitro* Terhadap Apoptosis Sel Tropoblas, Jumlah Blastosis dan Keberhasilan Transfer Embrio

Tahun Ke II dari Rencana 2 Tahun

Oleh:

Dr. Widjiati Msi., Drh NIDN 0015046204)
Dr. Epy Muhammad Luqman, Msi., drh NIDN 0013126703
Dr. Benjamin Christoffel Tchupuring, Msi., drh. NIDN 0015015505

DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGAMBIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTRIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI SESUAI
DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN SESUAI DENGAN
PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : Efektivitas Insulin Transferrin Selenium dan Bovine Serum Albumin pada Medium Kultur In vitro Terhadap Apoptosis Sel Tropoblas, Jumlah Blastosis dan Keberhasilan Transfer Embrio

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. drh. WIDJIATI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0015046204
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 081330649116
Alamat surel (e-mail) : widjiati@fkh.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr EPY MUHAMMAD LUQMAN M.Si
NIDN : 0013126703
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr BENYAMIN CHRISTOFFEL TEHUPURIN M.Si
NIDN : 0015015505
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000

Mengetahui,
Dekan FKH Universitas Airlangga



(Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., drh)
NIP/NIK 1956010519860110

Kota Surabaya, 13 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. drh. WIDJIATI, M.Si)
NIP/NIK 196209151990022001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian Dan Inovasi

(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., MSi., PhD)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan komposisi medium kultur *in vitro* yang mampu mensupport perkembangan sigot untuk berkembang dan membelah menjadi embrio blastosis yang siap untuk ditransfer. Dalam rangka mengoptimalkan kondisi medium kultur sehingga menghasilkan embrio dengan daya hidup yang tinggi, sebagai bank embrio untuk keperluan menunjang program transfer embrio, perlu menambahkan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) dan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dalam medium kultur *in vitro* mengikat radikal, memacu perkembangan sel, mencegah kerusakan sel karena peran antioksidan didalamnya, sehingga dapat meningkatkan viabilitas blastosis hasil kultur *in vitro*. Suplementasi *Bovine Serum Albumin* ke dalam media kultur dapat peningkatan kompetensi perkembangan embrio untuk tumbuh pada medium kultur *in vitro*.

Penelitian ini direncanakan dalam 2 tahun, penelitian tahun kedua terdiri dari beberapa tahapan penelitian yaitu produksi embrio secara *in vitro*, preparasi resipien dengan hormonal, Transfer Embrio menciit dengan metode bedah, pemeriksaan angka kebuntingan, pemeriksaan angka implantasi, pemeriksaan jumlah embrio yang tidak diimplantasikan, pemeriksaan jumlah fetus hidup dan pemeriksaan ekspresi integrin.

Hasil penelitian menunjukkan Prosentase angka kebuntingan induk setelah embrio ditransferkan pada kelompok perlakuan 1 (80%) lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan 2 (60%) dan kelompok perlakuan 3 (60%). Prosentase jumlah anak yang dilahirkan pada kelompok perlakuan 1 (80%) lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan 2 (44,4%) dan kelompok perlakuan 3 (40,7%). Prosentase jumlah embrio yang tidak implantasi pada kelompok perlakuan 1 (20%) lebih rendah dari pada kelompok perlakuan 2 (55,6%) dan kelompok perlakuan 3 (59,3%). Demikian juga ekspresi integrin pada kelompok perlakuan 1 sangat kuat yang ditandai warna coklat chromogen dibandingkan kelompok perlakuan 2 dan perlakuan 3.

Kesimpulan penelitian ini adalah prosentase induk bunting, jumlah anak yang dilahirkan dan ekspresi integrin pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % lebih baik dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 % , sedangkan prosentase Jumlah embrio yang tidak implantasi pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % lebih rendah dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 %. Terdapat perbedaan ekspresi integrin pada uterus yang diimplantasi embrio antar kelompok perlakuan. Kesimpulan kombinasi ITS dan BSA pada medium kultur dapat meningkatkan angka implantasi, kebuntingan, jumlah fetus yang dilahirkan dan ekspresi integrin. Saran yang disampaikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah perlu dipertimbangkan dan dikaji penambahan kombinasi ITS dan BSA untuk meredam pelepasan radikal bebas dalam medium kultur, medium fertilisasi dan medium vitrifikasi

Luaran yang dicapai dari penelitian tahun kedua adalah publikasi ilmiah pada jurnal *Veterinary World* EISSN: 2231-0916, volume 11, Nopember 2018 yang terindeks scopus Quartil 2, serta Seminar Internasional : 5 th Internasional Conference of Advance Moleculer Bioscience and Biomedical Engineering (ICAMBBE) 2018

PRAKATA

Syukur alhamdulillah kegiatan Pengabdian Masyarakat dengan judul “**Efektivitas *Insulin Transferrin Selenium* dan Bovine Serum Albumin pada Medium Kultur *In vitro* Terhadap Apoptosis Sel Tropoblas, Jumlah Blastosis dan Keberhasilan Transfer Embrio**” dapat kami laksanakan secara bertahap dengan baik.

Program penelitian ini dapat dilaksanakan atas pembiayaan dari dana Dikti tahun anggaran 2018. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Kementrian Riset dan Teknologi Direktorat Pendidikan Tinggi, Direktorat Riset dan pengabdian Kepada Masyarakat selaku pemberi dana untuk pelaksanaan kegiatan.
2. Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., MSi., PhD. selaku Lembaga Penelitian Dan Inovasi
3. Semua pihak yang telah membantu terlaksana dan selesainya penelitian

Akhirnya, diharapkan hasil penelitian ini dapat dikembangkan dan bermanfaat untuk ilmu pengetahuan dan pengembangan khususnya dibidang biologi reproduksi.

Surabaya, Oktober 2018



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUTAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.4. Luaran Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Tinjauan Apoptosis.....	4
2.2. Tinjauan Tentang <i>Insulin Transferin Selenium</i>	4
2.3. Tinjauan Tentang Bovine Serum Albumin.....	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	6
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	7
4.1. Rancangan Penelitian	7
4.2. Bahan Dan Alat Penelitian.....	7
4.3. Variabel Penelitian.....	7
4.4. Prosedur Penelitian	8
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	11
5.1. Hasil Penelitian	11
5.2. Luaran yang Dicapai	13
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	14
6.1. Kesimpulan.....	15
6.2. Saran.....	15
DAFTAR PUSTAKA.....	16

DAFTAR TABEL**Halaman**

Tabel 1. Prosentase angka kebuntingan pada kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS pada medium fertilisasi in vitro	11
Tabel2. Persentase jumlah embrio yang dimplantasikan, jumlah embrio yang tidak implantasi dan fetus yang dilahirkan pada kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS pada medium fertilisasi in vitro	12
Tabel 3. Rerata dan simpangan baku ekspresi integrin pada uterus yang diimplantasi embrio dari kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS	13

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Persentase angka kebuntingan induk setelah embrio ditransferkan	11
Gambar 2. Fetus berkembang dalam uterus induk	11
Gambar 3. Persentase jumlah embrio yang diimplantasikan, jumlah embrio yang tidak implantasi dan jumlah fetus yang dilahirkan antar kelompok perlakuan	12
Gambar 4. Ekpresi integrin paling kuat pada kelompok ITS dan Kombinasi BSA yang ditandai warna coklat chromogen , sedangkan kelompok penambahan ITS saja atau BSA saja ekpresi intergrin sedang, pembesaran 100 kali	13



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberhasilan Transfer embrio sangat ditentukan oleh kualitas embrio yang akan ditransfer dan kesiapan dari endometrium uterus. Embrio dikatakan mempunyai kualitas yang bagus bila embrio tersebut bisa berkembang dan tumbuh didalam rahim resipien. Embrio yang berkualitas dapat dihasilkan secara *in vitro* maupun secara *in vitro*. Embrio yang dihasilkan secara *in vitro* memiliki banyak kelebihan antara lain bisa dihasilkan dalam jumlah banyak dan umur yang seragam.

Saat ini penyediaan embrio secara *in vitro* untuk keperluan transfer embrio masih belum bisa memenuhi kualitas embrio dengan daya hidup yang tinggi. Hal ini berdasarkan pada hasil angka kebuntingan apabila embrio yang diproduksi secara *in vitro* ditransfer ke resipien menghasilkan angka kebuntingan yang masih rendah. Masih rendahnya angka kebuntingan ini perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat pada proses kultur embrio secara *in vitro* banyak faktor yang mempengaruhi antara lain sumber nutria dan stres selama kultur.

Untuk memaksimalkan kondisi medium kultur dalam rangka produksi embrio secara *in vitro* untuk kebutuhan transfer embrio, maka berbagai upaya dilakukan antara lain dengan merekayasa kondisi kultur *in vitro* supaya dapat meningkatkan daya hidup embrio tahap blastosis yang memenuhi kriteria layak transfer. Beberapa faktor pertumbuhan ditambahkan ke medium kultur yaitu *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* pematangan dan media pembiakan untuk meningkatkan kemampuan oosit berkembang ke tahap meiosis II. Beberapa

Insulin Transferrin Selenium merupakan suplemen media kompleks yang terdiri dari insulin, transferrin dan selenium yang bila ditambahkan dalam medium kultur dapat mengurangi mengikat radikal bebas (Das et al., 2013). *Insulin Transferrin Selenium* merupakan protein kompleks yang dapat memacu perkembangan sel, mencegah kerusakan sel karena peran antioksidan didalamnya, sehingga dapat mempertahankan viabilitas embrio. Menurut Qin et al., (2007) dan Amir et al., (2013), *Insulin Transferrin Selenium* dapat meningkatkan kualitas dan viabilitas blastosit hasil kultur *in vitro*.

Bovine Serum Albumin sebagai sumber protein yang mengandung banyak asam amino esensial. Suplementasi BSA dalam medium kultur dapat meningkatkan kompetensi perkembangan embrio untuk tumbuh pada medium kultur *in vitro*, mempercepat tahapan pembelahan embrio sehingga embrio bisa tumbuh dan berkembang secara maksimal menghasilkan blastosis yang excellen dan viabilitas embrio. Viabilitas embrio yang rendah akan mempengaruhi implantasi yaitu penempelan embrio pada endometrium. Penurunan kualitas dan viabilitas embrio juga disebabkan karena banyaknya sel tropoblas yang berfungsi sebagai plasenta embrionik mengalami apoptosis, akibatnya tidak terjadi implantasi dan kebuntingan. Selain itu ketebalan endometrium dari resipien harus siap menerima embrio (Sugimoto *et al.*, 2012; Gomez and Diez, : Sreenivas *et al.*, 2014; Koçyiğit *et al.*, 2015).

Viabilitas blastosis hasil kultur *in vitro* sangat mempengaruhi angka keberhasilan implantasi embrio dan terjadinya kebuntingan setelah blastosis tersebut di transfer keresipien. Oleh karena itu diperlukan studi untuk mengoptimalkan medium kultur, sehingga mampu memproduksi blastosis secara *in vitro* sebagai bank embrio untuk keperluan transfer embrio dan meningkatkan angka kebuntingan.

Berdasarkan latar belakang diatas perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan Efektivitas *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* pada Medium Kultur *In vitro* Terhadap Apoptosis Sel Tropoblas, Jumlah Blastosis dan Keberhasilan Transfer Embrio.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat disampaikan pada penelitian ini adalah :

1. Apakah suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan angka kebunting induk menci ?
2. Apakah suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan ekspresi integrine pada endometrium uterus ?
3. Apakah suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat menurunkan jumlah resorpsi embrio ?
4. Apakah suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan jumlah fetus hidup ?

1.3. Luaran Penelitian

Luaran penelitian ini adalah Publikasi jurnal nasional terakreditasi dan jurnal internasional

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Apoptosis

Sel mempunyai bekal kemampuan untuk melakukan proteksi yaitu berupa mekanisme perbaikan (repair) dan apoptosis. Embrio hasil kultur yang tidak bisa diperbaiki akan dihancurkan melalui mekanisme apoptosis atau mengalami kegagalan dalam proses fertilisasi dan tumbuh-kembangnya, sedangkan yang mampu bertahan akan terus tumbuh dan berkembang. Mekanisme apoptosis yang terjadi pada sel ini dapat dikendalikan pula oleh HSPs.

Heat Shock Factor (HSF)-1 merupakan protein yang bertanggungjawab untuk menginduksi terekspresinya HSPs baik pada kondisi fisiologis maupun sel yang mengalami stres. HSP70 menunjukkan mekanisme proteksi sel dengan mencegah aktivasi caspase yang bekerja proapoptotik. Dalam mekanisme proses apoptosis sel peran caspase 3 sangat menentukan. Hal yang perlu diwaspadai adanya kemungkinan embrio yang mampu tumbuh dan berkembang, tetapi mengalami kerusakan di tingkat DNA. Jika terdapat kelainan di tingkat DNA akan memicu munculnya kematian sel pada embrio yang akan di transfer (Qin *et al.*, 2007). Stres oksidatif yang ditimbulkan selama proses kultur akan meningkatkan TNF alfa yang merupakan salah satu faktor yang dapat menurunkan viabilitas embrio (Wuu *et al.*, 1999)

2.2. Tinjauan Tentang *Insulin Transferrin Selenium*

Asam amino dalam medium kultur akan meningkatkan perkembangan embrio dan meningkatkan angka keberhasilan implantasi (Zhiang and Armstrong, 1990). Dalam kultur sel, selain penambahan asam amino diperlukan komponen lain yaitu *Insulin transferrin selenium* dapat memacu perkembangan embrio tahap blastosis, meningkatkan motilitas sperma pasca *thawing*. Dari beberapa hasil penelitian penambahan asam amino tanpa *Insulin transferrin selenium* tidak mampu merangsang perkembangan maturasi oosit sapi (Cordova, 2009; Raghu *et al.*, 2002; Fengjun *et al.*, 2008; Kurzawa *et al.*, 2002, Soler *et al.*, 2003, Younis *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2008).

Insulin transferrin selenium diketahui selain mampu meningkatkan daya hidup dan proliferasi sel, juga mengikat radikal bebas, sehingga pada proses pembekuan *Insulin transferrin selenium* dapat menurunkan kematian *inner cell mass* dan *trophectoderm* setelah proses kultur (Archer *et al.*, 2003; Devreker *et al.*, 2001).

Kandungan transferin dan selenium membuat pertumbuhan sel menjadi lebih baik. Transferin mempunyai peran mengangkut zat besi ke dalam sel, sehingga pertumbuhan sel menjadi lebih optimal. Penambahan *Insulin transferrin selenium* mampu menekan radikal bebas dalam medium kultur. Selain itu *Insulin transferrin Selenium* dalam medium digunakan sebagai antioksidan. Kandungan selenium mengaktifasi *glutathione peroxidase* yang berfungsi dalam penekanan radikal bebas.

2.3. Tinjauan Tentang *Bovine Serum Albumin*

Bovine Serum Albumin memiliki beberapa asam amino yang dapat digunakan sebagai substrat energik oleh embrio. Penggunaan asam amino dalam media kultur bebas serum meningkatkan perkembangan embrio (Lee *et al.*, 2004). *Bovine Serum Albumin* dapat berperan sebagai antioksidan, mengendalikan pH dan osmolaritas. Asam amino juga dapat mengurangi stres dan sel fragmentasi disebabkan oleh dikultur embrio *in vitro* (Sugimoto *et al.*, 2012).

Bovine Serum Albumin embrio mempengaruhi efisiensi perkembangan embrio bila digunakan untuk *in vitro* maturasi, *in vitro* fertilisasi dan *in vitro* kultur. *Serum Bovine Albumin* secara luas digunakan sebagai protein sumber di pematangan oosit dan media kultur embrio. tergantung pada sumber, serum yang mengandung konsentrasi yang berbeda faktor pertumbuhan, hormon, asam amino dan protein yang mengikat yang ditemukan memiliki efek menguntungkan pada pematangan oosit dan perkembangan embrio karena mampu mencegah zona pengerasan. *Bovine Serum Albumin* menyebabkan perubahan dalam morfologi embrio, ultra struktur embrio, pembelahan kelahiran normal (Sreenivas *et al.*, 2014)



BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Umum

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan kondisi medium kultur sehingga bisa menunjang keberhasilan perkembangan embrio mencapai tahap blastosis

3.2 Tujuan Khusus Penelitian

Tujuan khusus dari ini adalah :

1. Membuktikan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan angka kebunting induk mencit.
2. Membuktikan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan ekspresi integrin pada endometrium uterus.
3. Membuktikan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat menurunkan jumlah embrio yang tidak implantasi.
4. Membuktikan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan jumlah fetus hidup.

3.3 Manfaat Penelitian

1. *Insulin Transferrin Selenium* dapat melindungi embrio dari radikal bebas dan *Bovine Serum Albumin* sebagai sumber protein selama kultur *in vitro* sehingga mampu meningkatkan perkembangan embrio
2. Penting untuk mencegah terjadinya apoptosis tropoblast selama kultur *in vitro* , sehingga akan meningkat daya hidup blastosis dan implantasi
3. Tingkat keberhasilan implantasi embrio sangat menentukan terjadinya kebuntingan.
4. Penelitian ini dapat mendukung program Transfer Embrio melalui tahapan produksi embrio *in vitro*.

Abstract

Insulin resistance is a condition in which the body's cells do not respond properly to the hormone insulin. This condition is often associated with obesity, high blood pressure, and high cholesterol. Insulin resistance can lead to type 2 diabetes if not managed properly.

Insulin resistance is a condition in which the body's cells do not respond properly to the hormone insulin. This condition is often associated with obesity, high blood pressure, and high cholesterol. Insulin resistance can lead to type 2 diabetes if not managed properly.

Insulin resistance is a condition in which the body's cells do not respond properly to the hormone insulin. This condition is often associated with obesity, high blood pressure, and high cholesterol. Insulin resistance can lead to type 2 diabetes if not managed properly.



BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan dihasilkan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium.. Penelitian ini terdiri dari 2 tahapan sebagai berikut, yaitu :

Penelitian tahun II

1. Produksi embrio secara in vitro
2. Preparasi resipien dengan hormonal untuk meningkatkan ketebalan endometrium
3. Transfer Embrio mencit dengan metode bedah
4. Pemeriksaan ekspresi intergrin pada uterus
5. Pemeriksaan jumlah embrio yang tidak implantasi
6. Pemeriksaan jumlah fetus hidup

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan umur 5 bulan, mencit betina umur 3 bulan, *Insulin Transferrin Selenium* (ITS), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Pregnant Mare Serum Gonodotropin*, *Human Chorionic Gonadotropin* (PMSG), *Phosphate Buffer Saline* (HCG), medium Engle Minimum (MEM), mineral oil, gentamycin sulfat, CO₂, antibodi integrin

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah inkubator CO₂, mikroskop inverted, program image motic, syringe, pipet pasteur, Hemi straw, petridish dispossible, millipore.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah : *Insulin Transferrin Selenium*, *Bovine Serum Albumin*

Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Angka kebuntingan
2. Ekspresi Intergrin

3. Jumlah embrio yang tidak implantasi
4. Jumlah fetus hidup

Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ruang penelitian, inkubator CO₂, peralatan, pemilihan alat ukur dari hasil penelitian, bahan-bahan yang digunakan pada penelitian.

3.4. prosedur Pengamatan

1. Superovulasi dan koleksi sel telur

Mencit betina disuntik dengan hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG atau Foligon) dengan dosis 5 IU. Empat puluh delapan (48) jam kemudian disuntik dengan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG atau Chorulon) dan langsung dikawinkan dengan mencit jantan yang sudah dikastrasi secara *monomating*. Tujuh belas (17) jam setelah mencit betina dikawinkan dilakukan pemeriksaan *vagina plug* (sumbat vagina). Mencit betina yang positif sumbat vagina selanjutnya dilakukan koleksi sel telur. Kemudian mencit betina yang positif sumbat vagina di dekapitasi, selanjutnya di bedah dan dikeluarkan tuba falopii. Selanjutnya tuba falopii dicuci dengan larutan *Phosphate Buffer Saline*, kemudian dipindahkan pada petridish selanjutnya dilakukan *flushing* di bawah mikroskop *inverted* dengan merobek kantong fertilisasi. Selanjutnya sel telur yang telah di *flushing* dicuci dan disiapkan untuk fertilisasi *in vitro*.

2. Kematangan Oosit

Sel telur pada gelas objek difiksasi dalam larutan fiksator yaitu campuran *asetic acid glacial* dan metanol dengan perbandingan 1:3, selanjutnya diwarnai dengan pewarna *aceto orcein* 1 % selama 1-2 menit, kemudian dilarutkan dengan larutan peluntur. Sediaan yang telah kering diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x untuk melihat tahapan *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle break down* (GVBD), Metafase I dan MetafaseII.

3. Fertilisasi *in vitro*

Sel telur yang sudah dikoleksi selanjutnya dicuci berturut-turut sebanyak tiga kali pada medium PBS dan MEM. Sel telur yang sudah dicuci kemudian dipindahkan pada medium Fertilisasi. Untuk menunggu persiapan spermatozoa

yang akan digunakan untuk Fertilisasi in vitro. Spermatozoa diambil dari cauda epididimis dari mencit jantan, kemudian dibenamkan pada medium Fertilisasi yang sudah ada sel telurnya. Sel telur yang sudah bercampur spermatozoa kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37° C selama 7 jam, kemudian dirontokan sel granulosa ntuk mengamati 2 pn.

4. Kultur embrio sampai tahap blastosis

Setelah terbentuk 2 pn, selanjutnya sigot dipindahkan dalam medium kultur dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Pergantian medium kultur dilakukan 2 hari sekali sampai embrio mencapai tahap blastosis.

5. Modifikasi medium kultur dengan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) dan atau tanpa *Bovine Serum Albumin*

Modifikasi medium kultur in vitro dengan suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) dan atau tanpa *Bovine Serum Albumin*. Secara keseluruhan penelitian ini terdiri dari 3 kelompok yaitu :

Kelompok Perlakuan 1 (P1) : MEM + ITS 5 % + BSA 5 %

Kelompok Perlakuan 2 (P2) : MEM + ITS 5 %

Kelompok Perlakuan 3 (P3) : MEM + BSA 5 %

6. Pemeriksaan ekspresi integrin pada endometrium uterus

Jaringan uterus difiksasi pada obyek glass, selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat, kemudian cuci dengan PBS, kemudian direndam pada 3% hidrogen peroksida H₂O₂(dalam DI water) selama 20 menit, 1% BSA dalam PBS 30 menit suhu ruang, antibodi integrin 1:1000 semalam, suhu dingin 4°C, Antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rat IgG Biotin Labelled*) dan antibodi primer integrin, 1 jam suhu ruang, SA-HRP (Sterp Avidin- Hoseradish Peroxidase), 60 menit, suhu ruang, Kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride), 20 menit, suhu ruang, Counterstain (*Aceto orcein*), 3 menit, suhu ruang kemudian diperiksa dibawah mikroskop. Setiap pergantian tahapan selalu dicuci denga PBS untuk membersihkan sisa bahan yang menempel.

7. Pengamatan Kebuntingan, Jumlah Embrio yang Tidak Implantasi, Jumlah Fetus Hidup

Pada hari ke 17 diamati terjadinya resorbsi embrio, jumlah fetus sebelum fetus dilahirkan hidup dan data ditabulasi dibandingkan dari



BAB. VII KESIMPULAN DAN SARAN

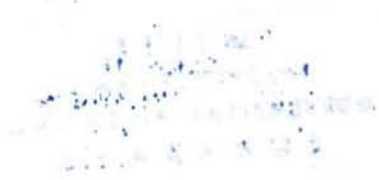
Kesimpulan

Kesimpulan dari sebagian penelitian yang sudah dikerjakan adalah :

1. Prosentase jumlah anak yang dilahirkan pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % lebih baik dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 %
2. Prosentase angka kebuntingan induk pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % lebih tinggi dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 %
3. Prosentase Jumlah embrio yang tidak implantasi pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % lebih rendah dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 %
4. Ekspresi integrin pada kelompok perlakuan suplementasi kombinasi ITS 5 % dan BSA 5 % sangat kuat yang ditandai warna coklat chromogen, sedangkan ekspresi integrin pada kelompok dari pada ITS 5 % atau MEM dengan BSA 5 % sedang yang ditandai coklat lemah.

Saran

Saran yang disampaikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah perlu dipertimbangkan dan dikaji penambahan kombinasi ITS dan BSA untuk meredam pelepasan radikal bebas dalam medium kultur, medium fertilisasi dan medium vitifikasi



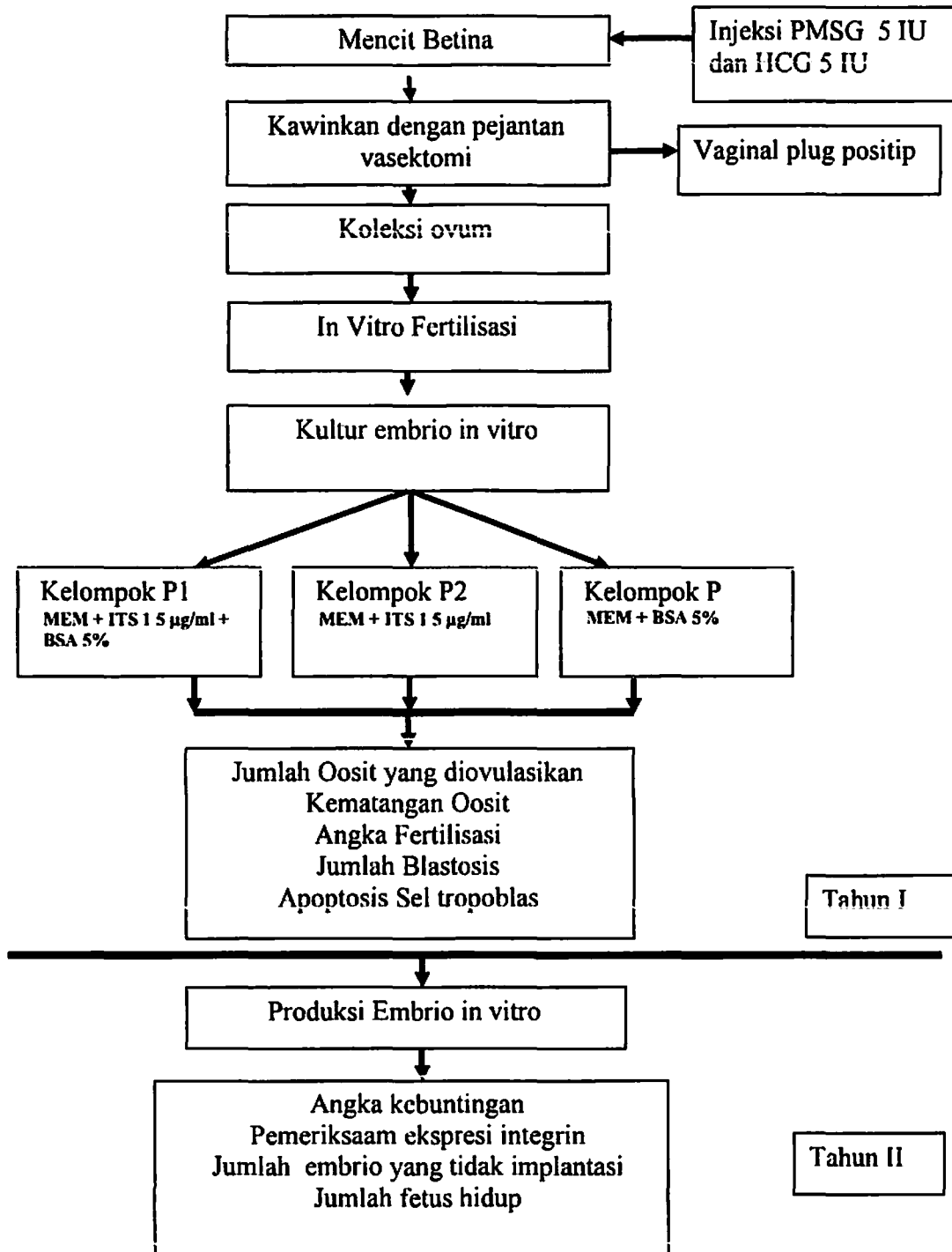
DAFTAR PUSTAKA

- Archer J., D.A. Gook and D.H. Edgar. 2003. Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture. *J Hum. Reprod.* 18 (8) :1669-1673
- Cordova, B.L. 2009. Effect of the addition of insulin transferrin selenium and ascorbic acid in the in vitro maturation medium of prepubertal bovine oocytes. *J. Anim. Physiol. Reprod.* 13 : 699-705
- Das, Z.C.,M.K., Gupta, S.J. Uhm and H.T. Lee. 2013. Supplementation of insulin transferrin selenium to embryo culture medium improves the in vitro development of pig embryos. *Cambridge J online* 18: 1-8 Apakah suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* dan *Bovine Serum Albumin* dapat meningkatkan
- Devreker F., K. Hardy, M. Van den Bergh, A.S. Vannin, S. Emiliani and Y. Englert. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *J.Hum. Reprod.* 16(4) : 749-756
- Fengjun, L., Z.Yuling, Y.Zijun, W. Guohua and Z.Yong. 2008. Effect of insulin transferrin selenium on goat oocytes maturation and embryo development. *J. Agricult. Sci and Techno.* 9 (3) : 107-110
- Gomez E. and C. Diez. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science* 58 : 23-37
- Han Qin, Tianxin Yu, Tingting Qing, Yanxia Liu, Yang Zhao, Jun Cai, Jian Li, Zhihua Song, Xiuxia Qu, Peng Zhou, Jiong Wu, Mingxiao Ding,¹ and Hongkui Deng. 2007. Regulation of Apoptosis and Differentiation by p53 in Human Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 282: 5842-5852.
- Jeong Y.W, M.S.Hosseini, D.P.Bhandari, Y.W.Kim, J.H.Kim, S.W.Park, E.Lee, S.M.Park, Y.I.Jeong, J.Y.Lee, S.Kim and W.S.Hwang. 2008. Effect insulin transferrin selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *J. Anim. Reprod. Sci* 106 : 13-24
- Kader A., A. Agarwal, R. Sharma and T. Falcone. 2009. Vitrification of isolated mice blastomeres using a closed loading device. *J.Reprod Biol Endocrinol.* 7: 17.
- Kisiday, I.D., B.Kurz, M.A.Dimicco and A.J.Grozinsky. 2005. Evaluation of medium supplemented with insulin transferrin selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. *J. Tissue Engineering.* 11 (1-2) : 141-151
- Koçyiğit Alper, Mesut Çevik, Uğur Şen, Mehmet Kuran. 2015. The Effect Of Macromolecule and Growth Factor Combinations On In Vitro Development Of Bovine Embryos. *Turkish J. of Veterinary and Anim Sci* 39: 308-313
- Kurzawa R., W. Glabowski, T. Baczowski and P. Brelik. 2002. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. *J. Clinic For Reprod. And Gynecol.* 2 (2) : 143-162
- Lee, E.S., et.al.(2004). Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured in vitro. *Anim.Reprod.Sci.*, 84: 257-267.

- Raghu ,H.M, S.M. Reddy and S.Nandi. 2002. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free, semidefined media. *J. Vet. Record* 151 : 260-265.
- Sreenivas D., DSVGK Kaladhar, Nagendra Sastry Yarla, VM Thomas, A PalniSamy, Varahala Rao Vadlapudi and R Preethi. 2014. In Vitro Production of Sheep Embryos in CR1aa Medium Supplemented with L-Ascorbic Acid. *J Tissue Sci Eng* 5:i
- Sugimoto H, Y. Kida, Y. Miyamoto, K. Kitada, K. Matsumoto, K. Sacki, T. Taniguchi, Y. Hosoi. 2012. Growth and development of rabbit oocytes in vitro: Effect of fetal bovine serum concentration on culture medium. *Theriogenology* 78 : 1040–1047
- Steeves T.E. and D.K. Gardner. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *J. Biol. Reprod.* 61(3):731-40.
- Zhang .X and d.T. Armstrong. 1990. Presence of amino acids and insulin in chemically defined medium improves development of 8 cell rat embryos in vitro and subsequent implantation in vivo. *J. Biol of reprod.* 42 (\$0 : 662-668

seluruh jumlah fetus yang yang berkembang. Jika menunggu fetus dilahirkan , akan kesulitan mengamati terjadinya resorpsi embrio, oleh karena itu dilakukan terminasi sebelum lahir.

Kerangka Penelitian



BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil Penelitian

1. Angka Kebuntingan

Prosentase angka kebuntingan induk setelah embrio ditransferkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Data prosentase jumlah anak yang dilahirkan dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2 dibawah ini

Tabel 1. Prosentase angka kebuntingan pada kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS pada medium fertilisasi in vitro

Kelompok	Ulangan	Prosentase jumlah induk bunting
P1	5	4 (80%)
P2	5	3 (60%)
P3	5	3(60%)

Keterangan:

Kelompok Perlakuan 1 (P1) : MEM + ITS 5 % + BSA 5 %

Kelompok Perlakuan 2 (P2) : MEM + ITS 5 %

Kelompok Perlakuan 3 (P3) : MEM + BSA 5 %



Gambar 1. Persentase angka kebuntingan induk setelah embrio ditransferkan



Gambar 2. Fetus berkembang dalam uterus induk

2. Implantasi dan jumlah Fetus yang dilahirkan

Prosentase jumlah anak yang dilahirkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Data prosentase jumlah anak yang dilahirkan dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1 dibawah ini

Tabel 2. Persentase jumlah embrio yang diimplantasikan, jumlah embrio yang tidak implantasi dan fetus yang dilahirkan pada kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS pada medium fertilisasi in vitro

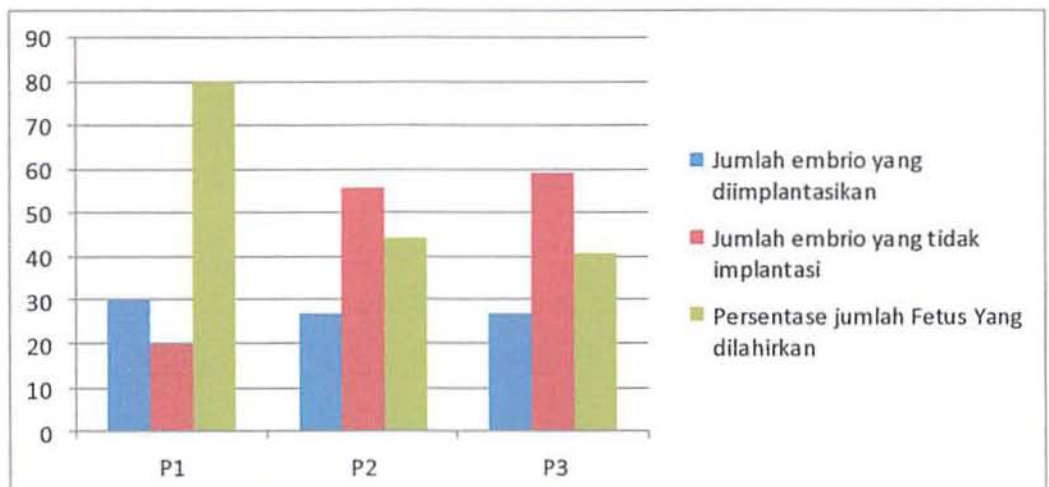
Kelompok	Jumlah embrio yang diimplantasikan	Jumlah embrio yang tidak implantasi	Persentase jumlah Fetus Yang dilahirkan
P1	30	6 (20 %)	24 (80%)
P2	27	15 (55,6%)	12(44,4)
P3	27	16 (59,3%)	11 (40,7%)

Keterangan

Kelompok Perlakuan 1 (P1) : MEM + ITS 5 % + BSA 5 %

Kelompok Perlakuan 2 (P2) : MEM + ITS 5 %

Kelompok Perlakuan 3 (P3) : MEM + BSA 5 %



Gambar 3. Persentase jumlah embrio yang diimplantasikan, jumlah embrio yang tidak implantasi dan jumlah fetus yang dilahirkan antar kelompok perlakuan

3. Ekspresi integrin pada uterus

Ekspresi integrin pada uterus mencit antara kelompok dilahirkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) lebih kuat yang ditandai warna coklat dari pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Tabel data hasil analisis statistic dan gambaran ekspresi integrin antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

Tabel 3. Rerata dan simpangan baku ekspresi integrin pada uterus yang diimplantasi embrio dari kelompok perlakuan penambahan BSA, ITS dan Kombinasi BSA dan ITS

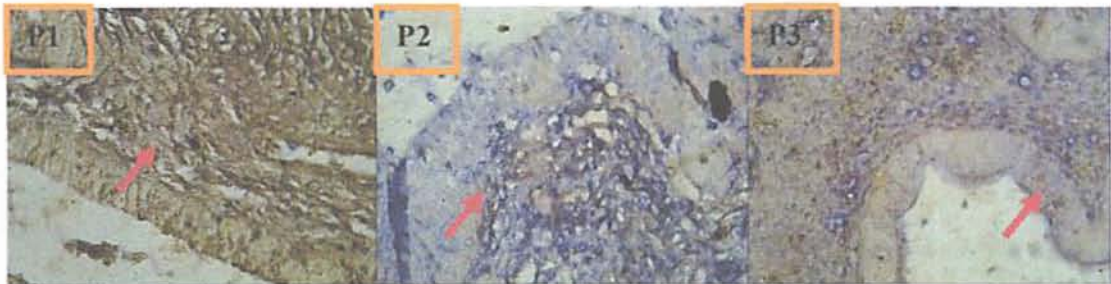
Kelompok	Mean \pm SD	signifikasi
P1	6,60 ^a \pm 1,95	0,000
P2	1,60 ^b \pm 1,52	
P3	1,80 ^b \pm 1,30	

Keterangan : superkrip yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata $p < 0,05$

Kelompok Perlakuan 1 (P1) : MEM + ITS 5 % + BSA 5 %

Kelompok Perlakuan 2 (P2) : MEM + ITS 5 %

Kelompok Perlakuan 3 (P3) : MEM + BSA 5 %



Gambar 4. Ekspresi integrin paling kuat pada uterus kelompok ITS dan Kombinasi BSA yang ditandai warna coklat chromogen, sedangkan kelompok penambahan ITS saja atau BSA saja ekspresi intergrin sedang, pembesaran 100 kali

5.2 Luaran yang dicapai

Luaran yang dicapai dari penelitian tahun kedua adalah :

1. publikasi ilmiah pada jurnal Veterinary World EISSN: 2231-0916, volume 11, Nopember 2018 yang terindeks scopus Quartil 2.



Genetics 2008, 2(1):1-10
 Available online at: www.geneticsjournal.com [Accessed 2018-01-01]

The profiling of pre- and post-warming DNA in mouse embryos with microsatellite method

Widiati¹, Widiati², Widiati³, Widiati⁴, Widiati⁵

¹Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
²Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
³Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
⁴Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
⁵Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia

Abstract
 The purpose of this study was to determine the DNA damage in mouse embryos during the pre-warming and post-warming stages. The study was conducted using microsatellite method. The results showed that the DNA damage in mouse embryos during the pre-warming and post-warming stages was significantly higher than the control group. The results also showed that the DNA damage in mouse embryos during the pre-warming and post-warming stages was significantly higher than the control group. The results also showed that the DNA damage in mouse embryos during the pre-warming and post-warming stages was significantly higher than the control group.

2. Seminar Internasional : 5 th Internasional Conference of Advance Molecular Bioscience and Biomedical Engineering (ICAMBBE) 2018

5th International Conference on Advanced Molecular Bioscience and Biomedical Engineering (ICAMBBE) 2018



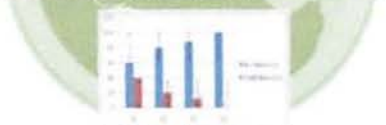
Swiss Bellinn Hotel, Malang, East Java, Indonesia
 September, 3rd – 4th 2018

PT-83
Cryoprotectant Combination Ethylene Glycol and Propanediol on Mice Blastocyst Viability Post Vitrification

Widiati¹, Widiati², Widiati³, Widiati⁴, Widiati⁵
¹Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
²Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
³Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
⁴Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia
⁵Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Airlangga University of Surabaya, Indonesia

INTRODUCTION. Vitrification is the best method to store frozen embryos because it is protecting the embryos from environmental diseases and infectious diseases. All cryoprotectants have a toxic effect that can cause embryo damage depending on its concentration and duration of exposure. During cryopreservation with vitrification method, there is physicochemical changing due to physicochemical stress. Morphological changing like fracture, cell lysis and degeneration of the membrane, and intracellular damage that causes toxicity with a total microscope. The main goal of vitrification can be maintained by giving the right combination during vitrification process. This research was conducted to find the effectiveness of vitrification using a combination of microsatellite cryoprotectants ethylene glycol (EG) and propanediol (PR) in the same stage of the embryos, especially blastocyst.

METHODS. This research was using mice embryos in blastocyst stage as the sample. There were 4 treatment groups in this research, Treatment Group 1 (T1) = PR + EG 20%, Treatment Group 2 (T2) = PR + PRG 50%, Treatment Group 3 (T3) = PR + EG 20% + PRG 50%, and Treatment Group 4 (T4) = PR + EG 10% + PRG 50%. **RESULTS AND DISCUSSION.** The combination could reduce the toxic effect from propanediol with microsatellite vitrification 20%, and the level of propanediol with concentration 50% could help reduce genetic damage more slowly during preservation in the vitrification but still there were blastocyst that become dead caused by the toxicity from ethylene glycol 20%. This study could be used as a reference for the combination of ethylene glycol with concentration 10% could reduce the toxicity from propanediol.



REFERENCE
 1) Widiati, Rani, SW, Airlangga, 2017. Pengaruh Kombinasi Krioprotektan Etanol dan Propandiol pada Proses Pembekuan Embrio. *Journal of Genetic Engineering*, Vol. 2, No. 1, 1-10.

1st International Conference on Advance Molecular Bioscience and Biomedical Engineering (ICAMBBE) 2018 Malang, 1-14



IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Veterinary World

Open access and peer reviewed international journal

NAAS (National Academy of Agricultural Sciences -INDIA) - 5.71, SCOPUS: Citescore - 0.87, SJR - 0.390, SNIP - 0.965

PUBLICATION CERTIFICATE

This is to certify that article entitled:

The profiling of pre- and post-warming DNA in mouse embryos with microsatellite method

Widjiati Widjiati, Soeharsono Soeharsono and Yeni Dhamayanti

has been published online at <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/November-2018/1.pdf> on 02-11-2018.

Citation: Widjiati W, Soeharsono S, Dhamayanti Y (2018) The profiling of pre- and post-warming deoxyribonucleic acid in mouse embryos with microsatellite method, *Veterinary World*, 11(11): 1526-1531.

doi: 10.14202/vetworld.2018.1526-1531

Anjum V. Sherasiya
Editor-in-Chief

Certificate issue date: 02-11-2018

EISSN: 2231-0916, Website: <http://www.veterinaryworld.org>

Corresponding author: Widjiati Widjiati, Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine
University of Airlangga, Surabaya, Indonesia. E-mail: widjiati@fkh.unair.ac.id