

0A
DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**PENAMBAHAN SERUM KUDA BUNTING PADA MEDIA
TC-199 UNTUK PEMATANGAN DAN
PEMBUAHAN OOSIT IN *VITRO*
KAMBING LOKAL**

Ketua Peneliti :

Tjuk Imam Restiadi, Drh.

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN



SELESAI
PAMERAN
1 JUL 2000

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai Oleh : Dana Rutin Unair 1998/1999
SK.Rektor Nomor : 6128/J03/PL/1998**

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**PENAMBAHAN SERUM KUDA BUNTING PADA MEDIA
TC-199 UNTUK PEMATANGAN DAN
PEMBUAHAN OOSIT IN *VITRO*
KAMBING LOKAL**

Ketua Peneliti :

Tjuk Imam Restiadi, Drh.

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

3000 17799 3141



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai Oleh : Dana Rutin Unair 1998/1999
SK.Rektor Nomor : 6128/J03/PL/1998**

1413 99 771 2006

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

MILIK
PEPUSAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PETAMBAHAN SERUM KUDA BUNTING PADA MEDIA
TC-199 UNTUK PEMATANGAN DAN
PEMBUAHAN OOSIT IN VITRO
KAMBING LOKAL

Ketua Panitia :

Tjuh Imam Restiadi, Dkk.

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

1413 99 771 2006



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibayar Oleh : Dana Rutin Uair 1987/1988
SK. Rektor Nomor : 6128/103/P/1988

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

1. HORSES
2. GENETIC TECHNIQUES

**PENAMBAHAN SERUM KUDA BUNTING PADA MEDIA
TC-199 UNTUK PEMATANGAN DAN
PEMBUAHAN OOSIT *IN VITRO*
KAMBING LOKAL**

KKC

KK

636.108 21

Pen

Peneliti :

Tjuk Imam Restiadi, Drh
DR. Laba Mahaputra, M.Sc., Drh
Suzanita Utama, M.Phil., Drh
Sri Mulyati, M.Kes., Drh
Budi Utomo, M.Si., Drh

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN



SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Dibiayai Oleh : DANA RUTIN Universitas Airlangga
SK. Rektor Nomor : 6128/JO3/PL/1998
Tanggal : 24 Agustus 1998



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit / Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C, Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Penambahan Serum Kuda Bunting Pada Media TC-199 Untuk Pematangan dan Pembuahan Oosit In Vitro Kambing Lokal
- b. Macam Penelitian : () Dasar () Terapan, (V) Pengembangan
() Instiusional
- c. Kategori Penelitian : () I (V) II () III () IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap Dengan Gelar : drh. Tjuk Imam Restiadi
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata - III/c - 131 837 003
- d. Jabatan Sekarang : Lektor Muda
- e. Fakultas / Jurusan : Kedokteran Hewan / Reproduksi dan Kebidanan
- f. Universitas : Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : 5 Lima) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kebidanan Veteriner FKH Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 22 Februari 1999
- b. Hasil Penilaian : () Baik Sekali (V) Baik
() Sedang () Kurang

Surabaya, 11 Maret 1999



Mengetahui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian : Penambahan Serum Kuda Bunting pada Media TC-199 untuk Pematangan dan Pembuahan Oosit *In Vitro* Kambing Lokal

Ketua Peneliti : Tjuk Imam Restiadi

Anggota Peneliti : Laba Mahaputra
Suzanita Utama
Sri Mulyati
Budi Utomo

Fakultas/ Puslit : Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Sumber Biaya : DANA RUTIN Universitas Airlangga
SK. Rektor Nomor: 6128/JO3/PL/1998
Tanggal: 24 Agustus 1998

=====

Perbaikan genetik ternak dapat diterapkan dengan mempercepat pengembangan ternak melalui bioteknologi bidang peternakan yaitu penerapan teknik transfer embrio dan fertilisasi *in vitro*.

Menurut Gordon (1994), fertilisasi *in vitro* adalah suatu teknik untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh induk betina dengan cara memanfaatkan oosit dari ovarium yang berasal dari induk yang dipotong dari Rumah Potong Hewan (RPH). dengan adanya fertilisasi *in vitro* akan didapatkan embrio secara masal dan seragam.

Untuk ternak kambing, fertilisasi *in vitro* dapat dicapai dengan efisiensi tinggi, karena dapat memanfaatkan ovarium kambing yang kurang bermanfaat dari RPH sebagai sumber oosit.

Selama ini penelitian fertilisasi *in vitro* masih menggunakan serum, hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) pada medium pematangan baik secara sendiri maupun bersamaan (Younis dkk., 1991; Keefer, dkk., 1993; Lim., 1994). Permasalahannya untuk mendapatkan bahan tersebut mengalami kesulitan karena masih impor dengan harga sangat mahal, sehingga dipakailah bahan lokal dengan alasan yang berlawanan. Digu- nakan serum kuda bunting karena relatif mudah mendapatkannya dan relatif tidak mahal.

Hipotesis yang dikemukakan adalah terdapat perbedaan tingkat maturasi oosit *in vitro* pada media TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 0%, 5% dan 10%. Juga tidak terdapat perbedaan tingkat cleavage embrio fase 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel pada proses pembuahan berikutnya.

Serum kuda bunting 60 hari, diperoleh dengan memisahkan serum dari darah, disentrifusi 3500 rpm 15 menit, dipisahkan serumnya selanjutnya diinaktivasi 56°C, tambahkan gentamisin, saring dengan miliphore 0,22 µm. Tambahkan pada media maturasi dengan konsentrasi 5% dan 10%.

Untuk mendapatkan oosit dengan melakukan aspirasi oosit dengan menusukkan jarum 18-G yang berisi *Oocytes Washing Solution* (OWS) pada folikel berdiameter 2-5 mm. Hasil kolek-

si oosit dievaluasi dibawah mikroskop stereo disekting 30-40 kali. Selanjutnya oosit dicuci dengan OWS 2 kali.

Maturasi (pematangan) pada cawan petri disposibel menggunakan media TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 0% (Kontrol), serum kuda bunting 5% dan serum kuda bunting 10% pada beberapa drop (=50 μ l/drop) dan ditutup dengan minyak mineral. Selanjutnya cawan petri dimasukkan inkubator CO₂ 5%, suhu 38,5°C dan kelembaban 95%. Pengamatan tingkat maturasi setelah 24 jam, menggunakan pewarnaan aceto-orcein 1% pada stadium metaphase II dengan adanya polar bodi I.

Pembuahan (fertilisasi) dengan memindahkan oosit matang pada cawan petri disposibel dengan media *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS). Media pembuahan dibentuk roset dan ditutup dengan minyak mineral, diisi spermatozoa kapasitas 1 jam sebelumnya pada inkubator CO₂ 5%, suhu 38,5°C dan kelembaban 95%. Pengamatan tingkat pembelahan (cleavage) embrio setelah 48 jam fertilisasi.

Didapatkan hasil persentase maturasi pada media TC-199 (Kontrol), TC-199 + serum kuda bunting 5% dan TC-199 + serum kuda bunting 10% adalah: 71,63 \pm 2,44% , 75,23 \pm 3,84% dan 79,00 \pm 4,65% . Persentase oosit yang membelah setelah fertilisasi pada media maturasi TC-199 (Kontrol), TC-199 + serum kuda bunting 5% dan TC-199 + serum kuda bunting 10% adalah: 40,89 \pm 4,09% , 53,32 \pm 2,04% dan 58,26 \pm 1,37% .

Kesimpulan yang didapatkan adalah terdapat perbedaan bermakna antara TC-199 (kontrol) dengan TC-199 perlakuan penambahan serum kuda bunting 5% dan serum kuda bunting 10%, baik untuk maturasi oosit dan cleavage embrio.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Esa atas rahmat, taufik dan hidayahNya telah terselesaikannya penulisan laporan penelitian ini.

Pada kesempatan ini ucapan terima kasih kami sampaikan kepada yang terhormat :

1. Rektor Universitas Airlangga, atas kepercayaannya untuk melaksanakan penelitian,
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga atas kelancaran administrasi mulai dari proses pengajuan sampai dengan pelaporan hasil penelitian,
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk melaksanakan penelitian,
4. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu, dalam memberikan bantuan dan kelancaran penelitian.

Sebagai suatu hasil karya manusia, sudah selayaknya tidak terlepas dari kekurangan di beberapa bagian laporan ini. Untuk itu segala saran dan kritik yang membangun kami harapkan untuk perbaikan penulisan laporan berikutnya.

Surabaya, Januari 1999

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR LAMPIRAN	iv
BAB I: PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Permasalahan	3
1.3. Tujuan dan Sasaran Penelitian	4
1.4. Kontribusi Penelitian	5
1.5. Hipotesis Penelitian	5
BAB II: TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Media Perkembangan Oosit dan Embrio	6
2.2. Perkembangan Embrio <i>In Vitro</i>	7
2.3. Faktor yang Berpengaruh pada Kehidupan Embrio ..	8
2.4. Serum Darah Hewan	9
2.5. Serum Kuda Bunting	10
2.6. Manfaat Gonadotropin bagi Perkembangan Oosit ..	11
BAB III: MATERI DAN METODA	14
3.1. Materi Penelitian	14
3.1.1. Bahan Penelitian	14
3.1.2. Alat Penelitian	14
3.2. Metoda Penelitian	15
3.2.1. Pengambilan Serum Darah	15
3.2.2. Koleksi Oosit	15
3.2.3. Pematangan Oosit	16
3.2.4. Kapasitas Spermatozoa dan Pembuahan <i>In Vitro</i>	17
3.3. Rancangan Penelitian	18
3.4. Analisis Data	19
BAB IV: HASIL PENELITIAN	20
4.1. Pematangan Oosit	20
4.2. Pembelahan Embrio	21
BAB V: PEMBAHASAN	23
5.1. Pematangan Oosit	23
5.2. Pembelahan Embrio	26
BAB VI: KESIMPULAN DAN SARAN	30
6.1. Kesimpulan	30
6.2. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Kumulatif Jumlah Maturasi Oosit pada Berbagai Media Perlakuan	21
2.	Kumulatif Jumlah Cleavage Embrio berbagai Stadia setelah Fertilisasi pada Media Perlakuan	22

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Cara Pembuatan Stock Media TC-199 dalam 1000 ml	35
2.	Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Medium Pencuci Oosit	36
3.	Komposisi dan Cara Pembuatan Medium EBSS Stock	37
4.	Teknik Pewarnaan Oosit Hasil Maturasi ...	38
5.	Data Pengaruh TC-199 (Kontrol) pada Maturasi Oosit	39
6.	Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 5% pada Maturasi Oosit .	39
7.	Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 10% pada Maturasi Oosit	40
8.	Transformasi Persentase Maturasi Oosit ke Tabel Arcsin	40
9.	Anava Maturasi Oosit Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting ...	41
10.	Uji BNT Maturasi Oosit Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting	41
11.	Data Pengaruh TC-199 (Kontrol) pada Cleavage Embrio Berbagai Stadia	42
12.	Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 5 % pada Cleavage Embrio Berbagai Stadia	42
13.	Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 10 % pada Cleavage Embrio Berbagai Stadia	43
14.	Transformasi Persentase Cleavage Embrio ke Tabel Arcsin	43
15.	Anava Cleavage Embrio Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting ...	44
16.	Uji BNT Cleavage Embrio Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting	44

BAB I
PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Penelitian

Peranan ternak kambing di pedesaan saat ini cukup besar karena pertimbangan harga relatif murah dan terjangkau oleh daya beli masyarakat, pemeliharaannya mudah dan daya reproduksi lebih cepat daripada ternak ruminansia besar. Mengingat hal demikian maka perlu dilakukan usaha-usaha pengembangan ternak kambing berupa penyediaan bibit, permordan, penyuluhan, pakan, pengendalian penyakit maupun perbaikan mutu genetik ternak. Perbaikan genetik ternak dapat diterapkan dengan mempercepat pengembangan ternak melalui bioteknologi bidang peternakan yaitu penerapan teknik transfer embrio dan fertilisasi *in vitro*. Fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu sarana agar biaya tranfer embrio dapat ditekan menjadi lebih murah.

Menurut Gordon (1994), fertilisasi *in vitro* adalah suatu teknik untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh induk betina dengan cara memanfaatkan oosit dari ovarium yang berasal dari induk yang dipotong dari Rumah Potong Hewan (RPH) atau yang berasal dari ternak betina unggul yang mengalami kelainan pada saluran reproduksi. Dengan teknik fertilisasi *in vitro* akan didapatkan embrio secara masal dan seragam.

Fertilisasi *in vitro* diakhiri dengan terbentuknya sigot, selanjutnya membelah dan berkembang menjadi embrio.

Pada proses fertilisasi *in vitro* dimungkinkan untuk melakukan pengamatan dan pengontrolan terhadap berlangsungnya proses tersebut, sehingga dapat menghasilkan embrio yang baik dan sehat. Seperti yang dikutip oleh Hardjopranjoto (1987) dari beberapa peneliti, bahwa tidak terdapat abnormalitas pada turunan hasil pembuahan *in vitro*, dari media pembuahan dalam tabung yang berbeda dengan cairan dari saluran alat kelamin betina, khususnya tuba falopii. Kenyataan menunjukkan bahwa di dalam lingkungan *in vitro*, sel telur dapat dibuahi dan berkembang menjadi embrio dengan kondisi yang sama seperti perkembangan sel telur di berbagai bagian tuba falopii dan uterus.

Untuk ternak kambing, teknologi fertilisasi *in vitro* dapat dicapai dengan efisiensi tinggi, karena dapat memanfaatkan ovarium kambing yang kurang bermanfaat dari RPH sebagai sumber oosit. Sehingga pada penelitian ini akan memanfaatkan ovarium kambing berasal dari RPH Pegirian Surabaya sebagai sumber oosit untuk kepentingan fertilisasi *in vitro*.

Banyak faktor yang mempengaruhi proses pembuahan *in vitro* diantaranya adalah keadaan lingkungan dalam media buatan yang digunakan, perlakuan oosit saat pematangan, perlakuan spermatozoa saat kapasitasi, pembuahan dan pembiakan embrio setelah pembuahan (Keefer dkk., 1993).

Proses pematangan oosit maupun perkembangan embrio *in vitro* media yang digunakan harus mempunyai fungsi mekanis,

fisis dan kimiawi, artinya media dapat memberikan lingkungan yang optimum untuk menjamin kelangsungan hidup oosit. Komposisi media harus mirip seperti suasana dalam alat kelamin betina, disamping juga dapat berfungsi sebagai lingkungan tempat persediaan nutrisi yang diperlukan untuk metabolisme dan diferensiasi sel oosit dan embrio. Zat nutrisi yang diperlukan harus selektif dapat disintesis oleh sel dan dalam konsentrasi tertentu serta memiliki angka keasaman (pH) yang baik dan susunan gas fisiologis (Supriatna, 1993).

1.2. Rumusan Permasalahan

Untuk memaksimalkan hasil pematangan oosit dalam pematangan *in vitro*, akhir-akhir ini banyak pakar menambahkan serum, hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam medium pematangan, baik secara sendiri maupun bersamaan (Younis dkk., 1991; Keefer dkk., 1993; Lim dkk., 1994). Biakan sel monolayer dari sel granulosa dan sel tuba dapat memproduksi *growth factor* yang diperlukan selain untuk pematangan sel juga saat pembelahan sel blastomer hingga dapat mencapai blastosis (Mahaputra, 1997).

Banyak peneliti menambahkan hormon misalnya gonadotropin seperti FSH, LH pada media pematangan oosit dan menghasilkan angka kematangan yang lebih baik. Kematangan oosit ini terjadi pada sitoplasma dan inti sehingga secara biokimiawi sel memudahkan terjadinya pembentukan pronukleus

jantan dan betina dalam sitoplasma selanjutnya dapat membantu proses pemuahan yang mendorong bersatunya kedua pronukleus tersebut menjadi sigot. Substitusi FSH, LH, estrogen, telah berhasil baik pada penelitian dengan menggunakan serum sapi birahi dan serum kuda birahi untuk maturasi oosit sapi madura dalam rangka fertilisasi *in vitro* (Mahaputra dkk., 1996).

Serum kuda bunting dapat ditambahkan pada media pematangan (maturasi), pemuahan (fertilisasi) dan kultur *in vitro* dan dapat digunakan sebagai pengganti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang selama ini sering digunakan (Mahaputra, 1997).

Dari berbagai kriteria pendukung permasalahan diatas maka dirumuskan permasalahan penelitian ini sebagai berikut :

1. Apakah ada perbedaan tingkat maturasi oosit *in vitro* antara kontrol dan perlakuan serum kuda bunting 5 % dan serum kuda bunting 10 %.
2. Apakah ada perbedaan tingkat cleavage embrio antara kontrol dan perlakuan serum kuda bunting 5 % dan serum kuda bunting 10 %.

1.3. Tujuan dan Sasaran Penelitian

Mengetahui dan menguasai teknik biakan oosit kambing dengan melakukan maturasi dan fertilisasi *in vitro* dan tingkat keberhasilannya dalam media TC-199 dengan penambahan serum kuda bunting pada berbagai konsentrasi.

1.4. Kontribusi Penelitian

Pemanfaatan oosit dari ovarium kambing yang berasal dari RPH sebagai sarana penyediaan oosit yang tak terhingga pada penggunaan fertilisasi *in vitro* secara masal.

Serum kuda bunting dengan harga relatif murah dan relatif mudah didapatkan, bila ternyata menghasilkan angka maturasi dan cleavage yang bagus dan banyak, maka dapat dipakai sebagai substitusi FSH, LH dan estrogen yang harganya sangat mahal dan sulit didapat.

Mendukung langkah berikutnya pada pengembangan pelaksanaan transfer embrio pada ternak dalam rangka meningkatkan produktifitas populasi ternak umumnya dan reproduktifitas ternak pada khususnya.

1.5. Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan tingkat pematangan (maturasi) oosit *in vitro* pada perlakuan pada media TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting konsentrasi 0% , 5% dan 10% .

Terdapat perbedaan tingkat pembelahan (cleavage) embrio stadia 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel setelah 48 jam proses fertilisasi pada perlakuan serum kuda bunting konsentrasi 0% , 5% dan 10% .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Media Perkembangan Oosit dan Embrio

Pada proses pematangan oosit dan perkembangan embrio *in vitro*, diperlukan media yang berfungsi sebagai tempat penyediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit. Nutrisi yang terdapat dalam media merupakan zat-zat terlarut seperti glukosa, asam amino dan ion anorganik yang diperlukan untuk metabolisme dan diferensiasi oosit maupun sel embrio. Zat nutrisi yang diperlukan harus selektif dan mempunyai konsentrasi yang sesuai, serta memiliki pH, susunan gas dan osmolaritas larutan fisiologis (Supriatna, 1992).

Media biakan *in vitro* harus mendekati sama seperti kondisi lingkungan *in vivo* dalam saluran reproduksi alamiah hewan betina dan juga mempunyai kemampuan merangsang perkembangan embrio. Untuk mencapai kondisi media yang baik diperlukan beberapa syarat antara lain; kemurnian media, tekanan gas yang sesuai, suhu dan kelembaban yang optimum. Pada umumnya media biakan mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) atau serum darah yang telah dinaktivasi pada suhu 56 °C selama 30 menit. Konsentrasi BSA dalam media biakan biasanya berkisar antara 5-20% (Hunter, 1995). Moor dan Trounson (1977) menyatakan: penambahan serum pada media biakan berfungsi sebagai sumber asam amino yang dibutuhkan oleh embrio sebagai nutrisi untuk metabolisme dan proliferasi sel.

2.2. Perkembangan Embrio *In Vitro*

Biakan embrio mamalia membutuhkan suatu lingkungan yang sesuai. Pada perkembangan awal, embrio mengalami beberapa kali pembelahan sampai terbentuk blastosis yang merupakan ukuran dari keberhasilan suatu biakan embrio (Peters, 1992). Embrio pada beberapa spesies mamalia sangat peka terhadap kondisi lingkungan terutama pada perkembangan awal. Perkembangan awal akan terhenti sampai tahap blastosis jika dibiakkan secara *in vitro* (Eyestone dan First, 1986).

Fertilisasi merupakan kejadian aktivasi oosit oleh spermatozoa. Tanpa stimulasi ini oosit tidak mampu membentuk pronukleus jantan dan betina selanjutnya menjadi sigot. Permulaan aktivasi pada sapi adalah vitelus mengkerut volumenya, keluarnya cairan masuk ke dalam ruang periviteline. Pada waktu yang sama, kepala spermatozoa dalam vitellus membengkak dan konsistensinya seperti gel, karakteristik bentuknya hilang sampai struktur akhir mirip nukleus, sehingga disebut pronukleus jantan (Gordon, 1994).

Waktu yang diperlukan spermatozoa untuk penetrasi oosit pada *In Vitro Maturation* (IVM) kurang dari 4 jam. Kepala spermatozoa berkondensasi terjadi 1-2 jam berikutnya dan pronukleus jantan berkembang setelah 3-5 jam berikutnya (Jiang, 1991).

2.3. Faktor yang Berpengaruh pada Kehidupan Embrio

Daya tahan embrio di dalam media biakan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti; komposisi media, tingkat pembelahan sel embrio, suhu penyimpanan embrio, tekanan udara, kelembaban, penggunaan bahan anti kristal pada suhu beku (Betteridge, 1977; Hafez, 1993).

Menurut Hill dkk. (1978) dan Hafez (1993) komposisi media *in vitro* mempunyai pengaruh sangat besar dalam ketahanan hidup dan perkembangan embrio selanjutnya. Sehingga komposisi media harus dibuat menyerupai kondisi uterus atau tuba falopii yaitu tempat dimana embrio berkembang secara alamiah. Komposisi dasar adalah seperti cairan alat reproduksi induk ditambah dengan protein ekstra dan sumber enersi. Untuk mencapai kondisi media biakan yang baik diperlukan beberapa syarat antara lain; kemurnian media, tekanan gas sesuai, suhu dan kelembaban inkubator optimum.

Batas perkembangan embrio pada penyimpanan secara *in vitro* yang paling berhasil adalah pada stadium akhir morula sampai blastosis pada sapi, sedangkan pada domba stadium 4-8 sel (Trounson dkk., 1978). Menurut Jacobson dkk. (1978), dalam pembiakan *in vitro* tidak ada perbedaan perkembangan embrio sapi pada tingkat pembelahan dini maupun tingkat perkembangan lanjut, asalkan embrio tersebut berada di dalam zona pelusida yang masih utuh.

Penyimpanan embrio dalam media dapat dilakukan pada suhu 37°C atau pada 4°C. Pada penyimpanan 37°C embrio mampu

bertahan selama 48 jam tanpa mengalami perubahan, pada penyimpanan 4°C embrio mampu bertahan selama 5 hari (Jillella, 1982).

Pemberian tekanan udara terutama mengandung CO₂ dan O₂ sangat penting peranannya dalam mempertahankan keseimbangan pH dan kelangsungan terjadinya sistem sitokrom oksidasi (proses pembentukan awal jaringan embrio). Komposisi udara bertekanan yang diberikan pada media biakan embrio adalah mengandung 5 % CO₂ dan 95 % O₂ (Hafez, 1993).

2.4. Serum Darah Hewan

Berbagai macam tipe serum darah seperti misalnya *Fetal Calf Serum* (FCS), serum anak sapi (calf) baru lahir, serum maternal, serum proestrus serum sapi superovulasi, serum anak sapi jantan (steer) atau fraksi albumin (*Bovine Serum Albumin/BSA*), sering digunakan sebagai supplement protein pada medium maturasi untuk mendorong maturasi inti dan sitoplasma dari oosit sapi.

Diantara ini semua, FCS adalah paling umum digunakan. Banyak bukti bahwa FCS kenyataannya lebih baik daripada BSA dalam meningkatkan persentase oosit sapi untuk mencapai metaphase II (Leibfried-Rutledge dkk., 1986; Sanbusho dan Threlfall, 1988; Younis dkk, 1986). Leibfried-Rutledge dkk (1986) menemukan bahwa BSA gagal untuk menyokong perluasan kumulus dari oosit sapi. Padahal Sanbusho dan Threlfall (1990) menduga bahwa keunggulan dari FCS salah diantaranya

karena berisi komponen faktor pendorong (*growth promoting*) tidak diketahui, yang tidak ada pada serum hewan dewasa, atau ketiadaan komponen (hormon dan immunoglobulin) akan memperlambat perkembangan *in vitro* dari sel.

Telah menjadi perdebatan mengenai kepentingan penggunaan serum pada maturasi oosit *in vitro* seperti beberapa peneliti membuktikan bahwa singkatnya meiosis karena ketiadaan serum (Suss dkk., 1988). Meskipun pada fertilisasi dan perkembangan *in vitro* bila pada media maturasinya berisi serum (Leibfried-Rutledge dkk., 1988). Penambahan serum dalam media biakan TC-199 untuk pematangan oosit memberikan pengaruh besar terhadap tingkat pematangan oosit, jumlah oosit yang berhasil dibuahi dan perkembangan embrio ke tahap blastosis (Fukui dkk., 1993). Selanjutnya Younis dkk. (1989) menyatakan bahwa penambahan serum dalam media biakan TC-199 dapat meningkatkan angka rata-rata penetrasi spermatozoa dan pembentukan pronukleus pada proses pembuahan *in vitro*.

2.5. Serum Kuda Bunting

Hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) disebut sebagai *non pituitary gonadotropin*. Gonadotropin ini sumbernya bukan berasal dari pituitary, merupakan bahan biologi aneh, yang diperoleh dari serum kuda bunting. Gonadotropin ini berulang kali disebut sebagai *Anterior Pituitary Like* (APL) hormon. Merupakan bahan protein alam, agak murah dalam harga dan cukup efektif bila digunakan agak

luas pada kedokteran veteriner (Jones dkk., 1977).

Hormon *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) nama lain PMSG pertama kali dapat dideteksi pada sirkulasi maternal antara hari ke 35-40. Konsentrasi akan meningkat dengan cepat dan puncaknya dicapai sekitar hari ke 70-80. Setelah derajat konsentrasi ini dicapai, konsentrasi akan menurun perlahan dan eCG tidak dapat dideteksi setelah hari ke 140-150 (Cupps, 1991; Jones dkk., 1977; Sharp, 1992).

Aktifitas utama PMSG seperti FSH tetapi juga mempunyai aksi seperti LH. Karena itu PMSG dikatakan sebagai hormon *FSH-like*. Mempunyai aksi periode lama karena dalam kenyataannya tidak melewati filter ginjal kuda. Pada kuda betina dengan ovarium maternal, menyebabkan perkembangan folikel dan akhirnya ovulasi ganda, ini dapat terjadi walaupun kuda betina dalam keadaan bunting. Selanjutnya diikuti pembentukan corpora lutea (Jones, dkk., 1977).

2.6. Manfaat Gonadotropin bagi Perkembangan Oosit

Menurut Hafez (1993), setiap lapisan sel kumulus oophorus mempunyai jumlah reseptor LH dan FSH yang berbeda-beda. Jumlah reseptor akan menurun dari lapisan yang terletak di pinggir ke lapisan tengah. Sel kumulus oophorus di sekitar oosit mempunyai afinitas yang rendah terhadap hormon gonadotropin, karena sedikitnya reseptor terhadap hormon tersebut.

Lapisan bagian dalam sel kumulus oophorus secara morfologis berhubungan erat dengan oosit. Antara oosit dan sel

kumulus oophorus dihubungkan oleh suatu rongga penghubung yang disebut *gap junction*. Rongga penghubung ini akan pecah bila ada rangsangan hormon gonadotropin dan hipofisa (Austin dan Short, 1990). Selanjutnya Breeton dkk. (1993) menyatakan bahwa hormon gonadotropin selain berfungsi merubah hubungan antara bermacam sel dalam folikel juga menyebabkan merenggangnya sel-sel kumulus oophorus. Reaksi kumulus tersebut terjadi bersamaan dengan pematangan oosit dalam folikel pra ovulasi. Chian dkk. (1994) menyatakan bahwa setiap stadium pematangan oosit mempunyai hubungan dengan perubahan dari sel kumulus, misalnya hubungan antara sel kumulus yang meregang dengan mendekatnya waktu ovulasi, disertai dengan keluarnya substansi gelatin antar sel. Selain itu sel kumulus pada saat tersebut mampu berfungsi mensekresikan progesteron.

Penelitian pada kambing, waktu maturasi yang dibutuhkan adalah sama dengan domba yaitu sekitar 24 jam, Younis dkk. (1991), menemukan penambahan FSH atau LH ke media TC-199 pada *In Vitro Maturation* (IVM) menghasilkan peningkatan bermakna pada tingkat maturasi. De Smedt dkk. (1992), maturasi dengan *Cumulus Oocyte Complexes* (COCs) dalam media IVM yang disuplemen hormon dan sel granulosa. Mereka menemukan banyak oosit dari folikel berdiameter 2-6 mm. dapat mencapai maturasi meiotik 86 % , padahal dari folikel 1-2 mm tidak (14 %).



Penelitian yang dilakukan oleh Jiang dkk. (1990), menggunakan gonadotropin (PMSG) dan insulin pada kultur *in vitro* kelanjutan *In Vitro Fertilization* (IVF) embrio. Memakai 3 tingkat berbeda dari 4 faktor yaitu; 1. *Oestrus Calf Serum* (OCS): 0, 10, 20 % ; PMSG: 0, 10, 50 IU per ml. ; insulin : 0, 10, 50 μ g per ml. dan osm.: 250-260, 290-300, 330-340 mM. Embrio dihitung pada perkembangan ke morula lanjut atau blastosit pada 5-7 hari setelah kultur. Ternyata perkembangan tertinggi pada OCS 10 % ; PMSG 50 IU per ml.; insulin 0 μ g per ml dan osm. : 290-300 mM.

BAB III
MATERI DAN METODA

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang diperlukan pada penelitian ini adalah : ± 150 ovarium kambing yang mengandung oosit, media pencuci oosit: *Oocyte Washing Solution* (OWS), media maturasi: TCM-199 (*Tissue Culture Medium-199, Medium 199, Hepes Modification*, Sigma M-2520), media kapasitasi dan fertilisasi: *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS, Sigma A-6132), serum kuda bunting, *Bovine Serum Albumin* (BSA, FAF free, Sigma A-60003), minyak mineral (Sigma M-8410), semen beku kambing, garam fisiologis, aquades, alkohol, kapas, kertas tissue, parafin, vaselin, dan antibiotika gentamisin.

3.1.2. Alat Penelitian

Peralatan utama yang digunakan : refrigerator, inkubator CO₂ (Compact CO₂ series 5000, Thermolyne, USA) dilengkapi pengatur suhu dan kelembaban, mikroskop inverted untuk koleksi dan pengamatan oosit dan embrio, mikroskop stereo dissecting, mikroskop compound, kabinet steril (laminair air flow, Speg Air Tech, PRC) dengan sinar ultra violet.

Peralatan penunjang adalah: meja penghangat, penangas air (waterbath), pengaduk magnet, sentrifuse (Hettich EBA 3S), timbangan mikro (electronic balance CHYO JP2-160), pipet mikro (100 µl dan 50 µl), kontainer semen beku N₂ cair,

thermometer, tabung reaksi, gelas erlenmeyer, gelas beker.

Peralatan habis pakai seperti: cawan petri disposibel diameter 35 mm, filter miliphore diameter 0,2 μm (Acrodics, Gelman Sciences), pipet pasteur, syringe disposibel 5 ml dan 10 ml dan jarum suntik 18-G.

3.2. Metoda Penelitian

3.2.1. Pengambilan Serum Darah

Serum darah dari kuda betina bunting diperoleh dari vena jugularis (sisi lateral leher) sebanyak 20 ml. Sampel darah dimasukkan dalam tabung kaca, didiamkan beberapa saat, dilakukan penusukan pada permukaannya, didiamkan pada suhu kamar selama 6 jam dalam posisi miring. Sampel darah dalam tabung selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, selanjutnya dipisahkan serumnya dan dinaktivasi pada inkubator bersuhu 56°C selama 30 menit. Tambahkan gentamisin 25 $\mu\text{g/ml}$, saring dengan filter miliphore diameter 0,22 μm . Selanjutnya serum dimasukkan dalam vial 1 ml dan disimpan dan freezer.

3.2.2. Koleksi Oosit

Pengambilan ovarium kambing lokal betina asal pemotongan Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Dimasukkan dalam kantong plastik berisi garam fisiologis, dimasukkan pada termos bersuhu konstan 37°C. Dibawa ke laboratorium, selanjutnya dimasukkan pada gelas beker berisi garam

fisiologis dan ditempatkan pada waterbath bersuhu 37°C.

Ovarium diambil satu persatu dan dikeringkan pada kertas tissue steril selanjutnya dipegang dengan tangan bersarung tangan (glove karet) pada satu tangan dan tangan satunya melakukan aspirasi dengan menusukkan syringe disposable 5 ml berjarum 18-G yang berisi *Oocyte Washing Solution* (OWS) (Lampiran 2) ke folikel berdiameter 2-5 mm. Satu tusukan 4-5 folikel yang diaspirasi, setelah seluruh folikel diaspirasi, aspirasi ganti pada ovarium lain. Seluruh koleksi cairan folikel dimasukkan ke dalam tabung koleksi dengan hati-hati melalui dinding tabung, ditempatkan pada rak di waterbath bersuhu 37 °C, biarkan 10 menit sampai oosit pada cairan folikel mengendap. Kemudian cairan dipisahkan pelan-pelan pada cawan petri 90 mm untuk dievaluasi di bawah mikroskop stereo dissecting pembesaran 30-40 kali. Koleksi oosit dicuci dengan OWS 2 kali, selanjutnya dicuci dengan media pematangan TC-199.

3.2.3. Pematangan Oosit

Pembiakan oosit dilakukan pada cawan petri diameter 35 mm. Media pematangan adalah TC-199 ditambahkan yang ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%, Na piruvat 100 µl, gentamisin 25 µg (Lampiran 1). Sebanyak ± 10 oosit diperlakukan dengan menambahkan serum kuda bunting 0% , 5% dan 10% pada media pematangan. Masing-masing perlakuan dibuat pada tetes (drop) di cawan petri (1 tetes = 50 µl). Tetesan media

tersebut ditutup dengan minyak mineral. Penutupan dengan minyak mineral ini berfungsi untuk mencegah penguapan media, mencegah kontaminasi, menjaga kelembaban maksimal, menjaga pH dan osmolalitas media dan mengurangi fluktuasi suhu yang ekstrem.

Pembiakan dengan menempatkan cawan petri pada inkubator dengan fase gas CO₂ 5 % dalam udara, suhu 38,5°C dan kelembaban maksimal. Pengamatan tingkat pematangan oosit dilakukan setelah 24 jam yaitu dengan membuat preparat pewarnaan oosit memakai larutan aceto-orcein 1% (Lampiran 4). Untuk mengamati oosit yang telah matang yaitu dengan melihat adanya polar bodi II dan atau 1 pronukleus pada oosit.

3.2.4. Kapasitas Spermatozoa dan Pembuahan *In Vitro*

Semen beku kambing dikeluarkan dari kontainer N₂ cair dan dithawing dengan cara dibiarkan selama ± 5 detik pada temperatur kamar kemudian direndam dalam air hangat bersuhu 37°C. Masukkan pada tabung sentrifuse berisi 1 ml larutan pencuci semen EBSS (lampiran 3), sentrifusi 1800 rpm 2 kali masing-masing selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan pipet pasteur steril, endapannya diperiksa dengan hemositometer diketahui konsentrasinya, selanjutnya konsentrasi dibuat menjadi $12,5 \times 10^6$ sel spermatozoa/ml.

Spermatozoa selanjutnya dipisahkan atau dicuci dengan tehnik swim-up selama 30 menit pada media EBSS. Hitung persentase hidup mati spermatozoa dan motilitas.

Teteskan media pembuahan EBSS berupa drop kecil pada cawan petri dengan bentuk roset (*rosette*), yaitu tetes besar ditengah berisi 100 μ l dikelilingi 3 tetes kecil berisi 50 μ l, tetes kecil tersebut dihubungkan dengan tetes besar. Selanjutnya bentuk roset ini ditutup dengan minyak mineral dan diekuilibrasikan pada inkubator CO₂ bersuhu 38,5°C selama 1 jam sebelum ditambahkan spermatozoa hasil swim-up 10 μ l pada tetesan besar ditengah. Simpan lagi pada inkubator CO₂ bersuhu 38,5°C selama 1 jam untuk kapasitasasi.

Selanjutnya tambahkan 5-10 oosit matang (24 jam maturasi) pada drop kecil untuk menjalani proses pembuahan. Cawan petri dimasukkan pada inkubator CO₂ bersuhu 38,5°C selama 48 jam. Pengamatan tingkat pembelahan embrio 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial 3 X 4 yaitu :

3 faktor perlakuan media pematangan TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 0 %, 5 % dan 10 % .

4 faktor jumlah embrio yang dihasilkan setelah pembuahan (2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel).

3.4. Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk deskriptif berupa persentase oosit yang matang setelah perlakuan dan pembelahan embrio setelah fertilisasi *in vitro*.

Untuk mengetahui perbedaan perlakuan media pematangan oosit dan perlakuan pada media pembelahan setelah fertilisasi *in vitro* digunakan analisis variansi satu jalur (one-way anova). Apabila terdapat perbedaan masing-masing perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil) (Stell dan Torrie, 1993).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Pematangan Oosit

Hasil pengamatan pematangan (maturasi) oosit kambing berdasarkan pada persentase terbentuknya polar bodi I dan telah tercapainya tahapan metaphase II dari pembelahan meiosis inti oosit. Pengamatan ini dilakukan 24 jam dari saat maturasi hasil koleksi oosit.

Rata-rata persentase pematangan pada media maturasi TC-199 (Kontrol), TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 5%, serum kuda bunting 10% adalah : $71,63 \pm 2,44 \%$, $75,23 \pm 3,84 \%$ dan $79,00 \pm 4,65 \%$ (Tabel. 1).

Untuk menentukan adanya pengaruh penambahan serum kuda bunting pada media maturasi oosit kambing, data persentase maturasi oosit tersebut ditransformasikan ke tabel Arcsin (Steel dan Torrie, 1993). Analisis statistik menggunakan anava satu arah dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Hasil analisis statistik ternyata menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) (Lampiran. 5).

Sedangkan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan serum kuda bunting dengan kontrol pada maturasi oosit kambing dilakukan uji BNT. Pada uji statistik menghasilkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kontrol dengan penambahan serum kuda bunting 5% dan dengan penambahan serum kuda bunting 10% (Tabel. 1).

Tabel 1. Kumulatif Jumlah Maturasi Oosit pada Berbagai Media Perlakuan

Perlakuan Media	Jml.Oosit	Jml.Maturasi % Maturasi(X±SD)
TC-199 (Kontrol)	67	48 71,63 ± 2,44 ^a
TC-199 + SKB 5 %	68	51 75,23 ± 3,84 ^b
TC-199 + SKB 10 %	70	55 79,00 ± 4,65 ^c

Keterangan : Tanda superkrip berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

4.2. Pembelahan Embrio

Pengamatan pembelahan (cleavage) embrio 48 jam dihitung dari saat oosit yang matang diinseminasi dengan spermatozoa pada media pemuahan EBSS.

Persentase rata-rata oosit yang membelah setelah pemuahan dari oosit yang dimatangkan pada media maturasi TC-199 (Kontrol), TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 5% dan TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting 10 % adalah : $40,89 \pm 4,09$ %, $53,32 \pm 2,04$ % dan $58,26 \pm 1,37$ % (Tabel. 2).

Untuk menentukan adanya pengaruh penambahan serum kuda bunting pada cleavage embrio kambing, data persentase cleavage embrio tersebut ditransformasikan ke tabel Arcsin. Analisis statistik menggunakan anava satu arah dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Hasil analisis statistik ternyata menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) (Lampiran. 10).

Sedangkan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan serum kuda bunting dengan kontrol pada cleavage embrio kambing dilakukan uji BNT. Pada uji statistik menghasilkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kontrol dengan penambahan serum kuda bunting 5% dan dengan penambahan serum kuda bunting 10% (Tabel. 2).

Tabel 2. Kumulatif Jumlah Cleavage Embrio Berbagai Stadia setelah Fertilisasi pada Media Perlakuan

Perlakuan Media	Jml. Oosit	C l e a v a g e				Jml. Cleavage % Cleav(X±SD)
		2 sel(%)	4 sel(%)	8 sel(%)	16 sel(%)	
TC-199 (Kontrol)	73	3(4,11)	3(4,11)	13(17,81)	11(15,07)	30 40,89±4,09 ^a
TC-199 + SKB 5%	77	2(2,60)	3(3,90)	17(22,08)	19(24,67)	41 53,32±2,04 ^b
TC-199 + SKB 10%	78	2(2,56)	5(6,41)	19(24,36)	20(25,64)	46 58,26±1,37 ^c

Keterangan : tanda superkrip yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna p(0,05).

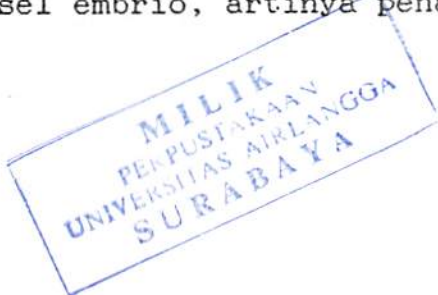
BAB V
PEMBAHASAN

5.1 Pematangan Oosit

Beberapa faktor yang berpengaruh pada pematangan oosit dan pembelahan embrio *in vitro* diantaranya adalah kondisi lingkungan media yang optimum, perlakuan pada oosit selama maturasi, perlakuan terhadap spermatozoa selama proses kapasitasi dan pembiakan embrio setelah pembuahan. Lingkungan media optimum artinya kondisi dibuat semirip lingkungan embrio *in vivo* seperti layaknya di dalam saluran reproduksi betina. Media tersebut harus memiliki fungsi mekanis, fisis dan khemis untuk kelangsungan hidup oosit dan embrio *in vitro*.

Serum diperoleh dari darah hewan yang telah mengalami filtrasi, in aktivasi panas dan pembekuan. Serum mengandung glukosa, protein, enzim, vitamin, zat anorganik, imunoglobulin juga mengandung hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam konsentrasi tertentu. Zat-zat yang terkandung dalam serum sangat dibutuhkan untuk proses metabolisme (Supriatna (1993). Sehingga penambahan serum dalam media biakan akan memenuhi kebutuhan akan protein, glukosa, hormon (FSH, LH, estrogen) dan faktor penumbuh yang penting untuk proses pematangan oosit *in vitro*.

Untuk pembiakan embrio *in vitro*, penambahan serum dalam media TC-199 mempunyai pengaruh *biphasik* terhadap pembelahan awal sel embrio, artinya penambahan serum pada awal pembe-



lahan atau 18 jam setelah pembuahan, serum akan menghambat pembelahan awal sel embrio tetapi bila ditambahkan pada 48-72 jam setelah pembuahan yaitu fase 8-16 sel dapat merangsang perkembangan embrio sampai menjadi kompak morula dan blastosis (Pinyopumintr dan Bavister, 1994). Atas pertimbangan tersebut maka pada penelitian ini serum kuda bunting ditambahkan pada waktu maturasi oosit.

Penambahan serum seperti fraksi albumin: *Bovine Serum Albumin* (BSA) pada media biakan berpengaruh pada tingkat pematangan oosit *in vitro*, seperti maturasi sitoplasma dan inti. Tingkat kematangan sitoplasma dan inti merupakan syarat keberhasilan proses pematangan oosit, pembuahan dan kelangsungan hidup embrio berikutnya (Younis, dkk. (1991). Penggunaan BSA 10% yang merupakan dosis tertinggi pada penelitian ini dilakukan karena sesuai dengan saran Hafez (1993) yang menyarankan bahwa penambahan serum ke dalam media biakan konsentrasinya sekitar 5 - 10% .

Proses pematangan oosit dipengaruhi oleh hormon FSH dan LH yang merupakan hormon gonadotropin berasal dari hipofisa anterior. Pematangan oosit sempurna terjadi saat gertakan hormon LH memuncak selama praovulasi, ditandai dengan terjadinya pelepasan polar bodi I dan tercapainya tahap metafase II dari pembelahan meiosis inti (Hafez, 1993). Beberapa peneliti yang dikutip oleh Younis dkk. (1991), melaporkan bahwa antara 90 - 100 % kultur oosit mencapai tahap metafase II dengan adanya hormon gonadotropin dan serum.

Penelitian yang dilakukan oleh Younis dkk. (1991) pada IVF oosit (dikelilingi kumulus) kambing (dari aspirasi folikel diameter 1-6 mm) pada media maturasi TC-199 + serum kambing 20 % dengan perlakuan LH 100 $\mu\text{g/ml}$, FSH 5 $\mu\text{g/ml}$ dan tanpa penambahan hormon menghasilkan persentase maturasi berturut-turut adalah 100 %, 90 % dan 60 %. Sedangkan pada penelitian ini persentase maturasi pada media maturasi TC-199 yang ditambahkan serum kuda bunting adalah $79,00 \pm 4,65$ %. Angka ini ternyata lebih besar daripada penelitian yang dilakukan oleh Younis dkk. (1991), dikarenakan pada penelitian ini medium selain ditambahkan serum juga BSA 1 %, sedangkan Younis dkk. (1991) tidak menambahkan BSA. Dimana BSA dalam konsentrasi tersebut ternyata mampu mendorong peningkatan jumlah maturasi oosit dan menopang oosit dalam perkembangannya mencapai stadium metaphase II.

Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) atau *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) merupakan hormon non pituitary gonadotropin. Mulai dapat dideteksi pada sirkulasi darah maternal kuda bunting antara hari ke 35-40 dan mencapai puncaknya antara hari ke 70-80, selanjutnya mulai menurun kadarnya. Aktifitas utama PMSG seperti FSH tetapi juga mempunyai sedikit aktifitas seperti LH (Jones dkk., 1977; Sharp, 1992). Selanjutnya Younis dkk. (1991) menyatakan bahwa preparat gonadotropin yang sering digunakan pada superovulasi dan IVF adalah eCG dan FSH, walaupun hasilnya FSH lebih superior.

Dalam penelitian ini digunakan preparat serum kuda bunting dengan pertimbangan bahan relatif mudah didapatkan dan didalamnya selain mengandung hormon PMSG juga hormon FSH, LH dan estrogen. Sehingga serum kuda bunting dapat digunakan sebagai substitusi pada penggunaan IVF, seperti yang telah dilakukan oleh Mahaputra dkk. (1996), yang telah berhasil baik menggunakan serum kuda birahi dan serum sapi birahi sebagai suplementasi media maturasi oosit sapi.

Dalam pematangan oosit kambing secara *in vitro* untuk mencapai metafase I diperlukan waktu 12-18 jam, dimana pelepasan polar bodi 18 - 21 jam selanjutnya metafase II tercapai setelah 22-26 jam (De Smedt dkk., 1992).

Pengamatan pematangan oosit kambing pada penelitian ini dilakukan 24 jam setelah mulai maturasi dengan pertimbangan parameter pengamatan yaitu tercapainya tahap metafase II dengan pelepasan polar bodi II. Untuk itu oosit hasil maturasi dibuat preparat pada obyek glas, ditutup dengan cover glas selanjutnya diwarnai memakai larutan aceto-orcein 1 % .

Hasil dari penelitian ini ternyata penambahan serum kuda bunting dengan konsentrasi 10 % per mililiter media TC-199 menghasilkan angka maturasi oosit paling baik.

5.2. Pembelahan Embrio

Keberhasilan pembuahan *in vitro* selain dipengaruhi oleh lingkungan dan kematangan oosit juga dipengaruhi oleh motilitas spermatozoa yang digunakan pada pembuahan oosit. Untuk

mendapatkan motilitas spermatozoa yang baik agar mampu menembus sel telur, maka spermatozoa harus mengalami kapasitas dan reaksi akrosom terlebih dahulu (Hafez, 1993).

Embrio yang berkembang setelah pembuahan sangat ditentukan oleh media yang digunakan selama pematangan (Bavister dkk., 1992).

Hafez (1993) menyatakan bahwa pembuahan sempurna akan terjadi bila saat penetrasi spermatozoa, pembelahan inti oosit sudah mencapai tahap metafase II.

Pengamatan oosit kambing yang berhasil membelah setelah 48 jam pembuahan ternyata memperlihatkan angka pembelahan berbeda-beda yaitu 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel. Ketidakseragaman pembelahan ini ternyata juga dilaporkan oleh peneliti-peneliti yang dikutip oleh Gordon (1994), diduga karena kurang serempaknya pematangan oosit atau dapat dikatakan bahwa oosit yang dimatangkan berasal dari stadium yang sangat beragam.

Pada penelitian ini digunakan media EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) ditambahkan 1 % piruvat baik pada media pencucian, media kapasitas spermatozoa maupun media pembuahan IVF. Juga ditambahkan pada media BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1 % . Pada penelitian yang dilakukan oleh Djati (1998) pada suplementasi PMSG + hCG + FCS (*Foetal Calf Serum*) menghasilkan produksi embrio terbaik dibandingkan dengan suplementasi PMSG atau hCG secara sendiri-sendiri.

Penelitian yang dilakukan oleh Keskin-tepe dkk.(1994) menggunakan oosit (*Oocyte-Cumulus Complexes/ OCCs*) kambing dari cairan folikel bediameter 2-5 mm, maturasi 27 jam dalam TCM-199 melaporkan bahwa mencapai maturasi 88,1 % pada penambahan kombinasi LH-FSH pada media IVF, menghasilkan proporsi fertilisasi (cleavage) terbesar yaitu 80 % dan mencapai stadium morula terbesar yaitu 40 % dibandingkan bila media hanya ditambahkan FSH, LH, hCG+FSH dan TSH. Ternyata hasil penelitian ini persentase maturasi pada penambahan serum kuda bunting 10 % pada media maturasi TC-199 tidak berbeda jauh yaitu ($79,00 \pm 4,65$ %), sedangkan persentase membelah ($58,26 \pm 1,37$ %) dan mencapai stadium 16 sel 25,64 % ini lebih rendah karena pada penelitian Keskin-tepe dkk. (1994) pada waktu inseminasi menggunakan sperma ejakulasi pada media ditambahkan heparin (10 microgram/ml) dan caffein (0,4 microgram/ml).

Bila dilihat dari perkembangan mulai maturasi oosit menghasilkan persentase maturasi setelah 24 jam berturut-turut meningkat mulai dari kontrol, perlakuan serum kuda bunting 5 % dan serum kuda bunting 10 % yang ditambahkan pada media maturasi TC-199. Demikian juga setelah dilakukan fertilisasi dan menghasilkan persentase pembelahan setelah 48 jam berturut-turut meningkat mulai dari kontrol, penambahan serum kuda bunting 5 % dan serum kuda bunting 10 %. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa jumlah oosit yang mengalami maturasi (angka maturasi) menentukan jumlah pembe-

lahan embrio (angka pembelahan), dalam artian angka maturasi berkorelasi positif terhadap angka pembelahan.

Pada penelitian yang dilakukan ini penambahan serum kuda bunting 10% pada media maturasi TC-199 ternyata memberikan hasil terbaik pada persentase cleavage embrio ($58,26 \pm 1,37$ %) secara kumulatif (2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel), dibandingkan dengan penambahan serum kuda bunting 5 %, apalagi dengan kontrol.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Penambahan serum kuda bunting pada media maturasi oosit kambing pada fertilisasi *in vitro* memberikan angka pematangan (maturasi) oosit dan angka pembelahan (cleavage) embrio lebih besar dibandingkan dengan tanpa penambahan pada media TC-199.

Penambahan serum kuda bunting 10% ternyata memberikan angka maturasi dan cleavage terbesar.

Terdapat perbedaan tingkat maturasi oosit *in vitro* dan tingkat cleavage embrio stadia 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel antara kontrol dan perlakuan penambahan serum kuda bunting 5% dan 10% .

6.2. Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan pada penggunaan serum kuda bunting dengan konsentrasi terbagi dengan kombinasi bahan lain dan pada spesies lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hallenkant dan T. Pinyopummintr. 1992. Development of *In Vitro* Matured/ *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos into Morula and Blastocyst in Defined Culture Media. *J. Theriogenology* 37: 127-146.
- Betteridge, K.J., M.D. Eaglesome, G.C.B. Randall and D. Mitchell. 1977. Collection Description and Transfer of Embryos from Cattle 10-16 Days after Ostrus. *J. Reprod. Fert.* 79: 205.
- Breeton, B., B. Jalabert, A. Fostier and C. Weil. 1993. Oocyte Maturation in Vertebrates In: *Vertebrate Endocrinology, Fundamentals and Biomedical Implication*. Vol 4. Part A. Reproduction. Academic Press Inc., New York. p: 63-96.
- Chian, R. C., K. Okuda and K. Niwa. 1994. Effect of Cumulus Cells Present during Different Periods of Culture on Maturation *In Vitro* of Bovine Oocytes. *J. Theriogenology* 41:176.
- Djati, M.S. 1998. Ringkasan Disertasi: Pengaruh Suplementasi PMSG dan hCG pada Proses Fertilisasi *In Vitro* dan Kultur Klon Embrio Sapi dengan IGF-1. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- De Smeds, V., N. Crozet, M. Ahmed-Ali, A. Martino and Y. Cognie. 1992. *In Vitro* Maturation and Fertilization of Goat Oocytes. *J. Theriogenology* 37: 1049-1060.
- Eyestone, W.H., and N.L. First. 1986. A Study of The 8-to-16 Cell Developmental Block In Bovine Embryos Cultured *In Vitro*. *J. Theriogenology* 25: 152.
- Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1989. Effect of Sera, Hormones and Granulosa Cells added to Culture Media for *In Vitro* Maturation, Fertilization, Cleavage and Development of Bovine Oocytes. *J. Reprod. and Fert.* 86 : 501-506.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB. International. Wallingford.
- Hafez, E.S.E. 1993. Fulliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation, Transport and Survival of Gametes, Fertilization. In: *Reproduction in Farm Animals*. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. p: 144-188.

- Hardjopranojoto, S. 1987. Pembuahan *In Vitro* dan Transfer Embryo. Pidato Pengukuhan Peresmian Penerimaan Guru Besar. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. hal: 4-11.
- Hill, J.R., L.J. Loszcz, J.R. Datzler and J.R. Boone. 1987. Culture of Ovine and Bovine Ova. *J. Animal Sci.* 47 : 908-913.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Edisi 1. Penerbit ITB. Bandung.
- Jacobson, M.E., A.O. Trounson and B.F. Shea. 1978. Frozen Storage and Transfer of Bovine Embryos. *J. Animal Sci.* 47 : 677-681.
- Jiang, H.S., W.L. Wang, K.H. Lu and I. Gordon. 1990. Effects of PMSG, Insulin, Osmolality and Oestrus Cow Serum on Development of IVF Early Embryos on Granulosa Cell Monolayer. *J. Theriogenology* 33: 258.
- Jillella, D. 1982. Embryo Transfer Technology and Its Application In Developing Countries American Development Foundation. p: 1-33.
- Jones, L.M., N.H. Both and L.E. McDonald. 1977. *Veterinary Pharmacology.*
- Keefer, C.L., R. Koppang, A.M. Paprocki, P. Golueka, S. Stice, M. Maki-Laurila and L. Mathews. 1993. Bovine Inner Cell Mass (ICM) Cells Donor Nuclei In The Production of Nuclear Transfer Embryos. *J. Theriogenology* 39: 242.
- Keskintepe, L., G.M. Darwish, A.I. Younis and B.G. Brackett. 1994. *In Vitro* Development of Morulae from Immature Caprine Oocytes. *Zygote*, May 2(2): 97-102.
- Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First. 1986. Effects of Fetal Calf Serum and Bovine Serum Albumin on *In Vitro* Maturation and Fertilization of Bovine and Hamster Cumulus-Oocyte-Complexes. *J. Biol. of Reprod.* 35: 850-857.
- Lim, J.M., J.H. Kim, K. Okuda and K. Niwa. 1994. The Importance of NaCl Concentration In a Chemically Defined Medium for The Development Bovine Oocytes Matured and Fertilized *In Vitro*. *J. Theriogenology* 42: 421-432.

- Mahaputra, L., A. Hinting, H.A. Hermadi, I. Mustofa, S. Utama, dan P. Srianto. 1996. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi Madura. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3. Dirjen Dikti. Depdikbud. Jakarta.
- Mahaputra, L., A. Hinting, H.A.Hermadi, I.Mustofa, P. Srianto, dan R. Wirjoatmodjo 1997. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi Madura. Sub Fertilisasi *In Vitro* pada Sapi Madura. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/4. Dirjen Dikti. Depdikbud. Jakarta.
- Moor, R.M. and A.O. Trounson. 1977. Hormonal and Follicular Factors Affecting Maturation of Sheep Oocytes *In Vitro* and Their Subsequent Developmental Capacity. *J. Reprod. and Fert.* 49: 101-109.
- Petters, R.M. 1992. Embryo Development *In Vitro* to The Blastocyst Stage In Cattle, Pig and Sheep. *An. Reprod. Sci.* 28: 415-421.
- Pinyopumintr, T. and B.D. Bavister. 1994. Development of Bovine Embryo in a Cell Free Culture Medium Effects of Serum, Timing of Its Inclusion and Heat in Activation. *J. Theriogenology* 41: 1241-1249.
- Sanbusho, A. and W.R. Threlfall. 1988. The Influence of serum and Gonadotropins on Bovine Oocyte Maturation *In Vitro*. Abstract. *J. Theriogenology* 29 : 301.
- Sharp, O.C. 1992. Pregnant Mare and Jenny In : World Animal Science. Book: C. Production System Approach. Horse Breeding and Management. Editor: J.W. Evans. Elsevier Science Publishers B.V.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi Kedua. P.T. Gramedia. Jakarta.
- Supriatna, I. 1993. Pengaruh Penambahan Fetal Serum, Calf Serum dan Bovine Serum dalam Pupukan *In Vitro* terhadap Viabilitas Embrio Mencit. Laporan Penelitian Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. IPB. Bogor.
- Suss, U., K. Wuthrich and G. Stranzinger. 1988. Chromosomes Configurations and Time Sequences of The First Meiotic Division in Bovine Oocytes Matured *In Vitro*. *J. Biol. of Reprod.* 38: 871-880.

Trounson, A.O., B.F. Shea, G.W. Ollis and M.E. Jacobson. 1978. Frozen Storage and Transfer of Bovine Embryos. *J. Anim. Sci.* 47: 677-681.

Younis A.I., B.G. Brackett and R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of Serum and Hormones on Bovine Oocyte Maturation and Fertilization *In Vitro*. *J. Gamete Research* 23 : 189-201.

Younis, A.I., K.A. Zuelke, K.M. Harper, M.A.L. Oliveira and B.G. Brackett. 1991. *In Vitro* Fertilization of Goat Oocytes. *J. Biol. of Reprod.* 44: 1177-1182.

Lampiran 1. Cara Pembuatan Stock Media TC-199 dalam 1000 ml

Tambahkan bubuk TC-199 9,9 gram (dalam 1 bungkus) dengan 900 ml deionized water. Selanjutnya tambahkan sodium bikarbonat (NaHCO_3) 2,2 gram. Larutkan dan buat pH menjadi 7,4 dengan menambahkan larutan NaOH atau HCl.

Pembuatan Media TC-199 untuk maturasi oosit

TC-199 stock	9 ml
BSA	1 ml
Na piruvat	100 μl
gentamisin	5 μl (25 μg)

Kemudian tambahkan PMSG 5 IU, 10 IU atau serum kuda bunting 5 % dan 10 % . Saring dengan filter miliphore 0,22 μm dan disimpan dalam freezer dan siap digunakan sebagai media maturasi oosit.

Untuk membuat drop maturasi dengan meneteskan beberapa drop (=50 μl /drop) pada cawan petri disposibel dan ditutup dengan parafin cair/ minyak mineral. Tempatkan pada inkubator selama 2 jam sebelum digunakan maturasi oosit.

Lampiran 2. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Medium
Pencuci Oosit

Bahan TL HEPES Stock dalam 500 ml.

NaCl	3,300 g
KCl	0,120 g
NaHCO ₃	0,084 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,028 g
atau anhidrous	0,024 g
Na laktat	930 µl
HEPES	1,200 g
Penisillin	0,032 g
Phenol merah	0,005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,150 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,050 g

Buat pH menjadi 7,4, osmolaritas 255-270 mOsm. Saring dengan filter miliphore kemudian masukkan ke dalam botol steril. Simpan pada freezer 4°C (tahan selama 1-2 minggu). Tambahkan Na piruvat, gentamisin dan BSA pada saat akan digunakan.

Media OWS atau TL HEPES (medium pencuci) dalam 100 ml

TL HEPES Stock	99 ml
Na piruvat	1,0 ml
gentamisin	50 µl (2,5 mg)
BSA fraksi V	0,3 g

Saring dengan filter miliphore 0,22 µm, letakkan dalam waterbath bersuhu 39°C.

Lampiran 3. Komposisi dan Cara Pembuatan Medium EBSS Stock

Komposisi bahan kimia dalam g/l.

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,265
MgSO ₄	0,09767
KCl	0,4
NaCl	6,8
NaPO ₄ monobasik	0,122
D-glukosa	1,0
Phenol merah	0,011

Komposisi medium pencuci dan kapasitas spermatozoa dan fertilisasi

Komposisi bahan dalam 100 ml/mg

EBSS stock	0,87
BSA	1,25
Na piruvat 1 %	0,10
gentamisin	25 µg/ml
JT Beker	100 ml



Lampiran 4. Teknik Pewarnaan Oosit Hasil Maturasi

Oosit hasil maturasi sebelumnya dicuci 2 kali dengan media OWS, kemudian dihilangkan kumulusnya dengan menggunakan pipet berdiameter sedikit lebih besar dari diameter oosit tersebut.

Selanjutnya oosit ditempatkan pada gelas obyek dan ditutup dengan gelas cover dengan perekat vaselin pada tepi gelas obyek.

Tekan pelan-pelan gelas penutup sampai oosit melekat pada obyek gelas. Celup preparat tersebut pada larutan fiksasi (asam asetat 90% : ethanol 70% perbandingan 1 : 3) selama 2- 3 malam.

Preparat hasil fiksasi ditiriskan pada kertas tissue. Pewarnaan oosit dilakukan dengan memakai larutan aceto-orcein 1% selama 2 menit. Berikutnya teteskan larutan pembersih (decolorisasi) berupa asam asetat 90%, gliserin dan ethanol 70% perbandingan 1 : 1 : 3, dengan cara meneteskan pada celah tepi atas penutup.

Selanjutnya tepi-tepi gelas cover ditutup dengan lem permanent untuk mencegah oosit dari kekeringan.

Preparat dibersihkan dan siap dilakukan pengamatan oosit menggunakan mikroskop stereo pembesaran 300 kali.

Lampiran 5. Data Pengaruh TC-199 (Kontrol) pada Maturasi Oosit

Ulangan	Jml.Oosit	Jml.Maturasi (%)
1	12	9(75,00)
2	15	11(73,33)
3	10	7(70,00)
4	17	12(70,58)
5	13	9(69,23)

Lampiran 6. Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 5 % pada Maturasi Oosit

Ulangan	Jml.Oosit	Jml.Maturasi (%)
1	14	11(78,57)
2	13	10(76,92)
3	16	11(68,75)
4	13	10(76,92)
5	12	9(75,00)

Lampiran 7. Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 10 % pada Maturasi Oosit

Ulangan	Jml.Oosit	Jml.Maturasi (%)
1	12	9(83,33)
2	15	12(80,00)
3	15	11(73,33)
4	16	12(75,00)
5	12	10(83,33)

Lampiran 8. Transformasi Persentase Maturasi Oosit ke Tabel Arcsin

Ulangan	TC-199(Kontrol)	TC-199 + SKB 5%	TC-199 + SKB 10%
1	60,00	62,42	65,90
2	58,91	61,28	63,44
3	56,79	56,01	58,91
4	57,16	61,28	60,00
5	56,33	60,00	65,90

Lampiran 9. Anava Maturasi Oosit Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting

----- ANALYSIS OF VARIANCE -----

HEADER DATA FOR: B:DATA-3 LABEL: Maturasi Oosit Kambing
NUMBER OF CASES: 5 NUMBER OF VARIABLES: 3

ONE-WAY ANOVA

Tingkat Maturasi Oosit Kambing

	GROUP	MEAN	N				
	1	57.838	5				
	2	60.198	5				
	3	62.830	5				
	GRAND MEAN	60.289	15				
SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB.		
BETWEEN	62.362	2	31.181	4.852	.0286		
WITHIN	77.110	12	6.426				
TOTAL	139.472	14					

Lampiran 10. Uji BNT Maturasi Oosit Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting

Rataan	Perlakuan	Group 1	Group 2	Group 3
57,8380	Group 1			
63,6880	Group 2	*		
66,3980	Group 3	*		

Uji BNT dengan tingkat kemaknaan 0.05. Mean= 1,5486

Group 1 : TC-199 (Kontrol)
Group 2 : TC-199 + Serum Kuda Bunting 5%
Group 3 : TC-199 + Serum Kuda Bunting 10%

Lampiran 11. Data Pengaruh TC-199 (Kontrol) pada Cleavage Embrio Berbagai Stadia

Ulangan	Jml. Oosit	C l e a v a g e				
		2 sel (%)	4 sel (%)	8 sel (%)	16 sel (%)	Jml.Cleav(%)
1	15	1(6,67)	1(6,67)	1(6,67)	3(20,00)	6(40,00)
2	12	0(0,0)	0(0,0)	3(25,00)	2(16,67)	5(41,67)
3	14	1(7,14)	0(0,0)	2(14,29)	2(14,29)	5(35,71)
4	17	1(5,88)	1(5,88)	4(23,53)	2(11,76)	8(47,06)
5	15	0(0,0)	1(6,67)	3(20,00)	2(13,33)	6(40,00)

Lampiran 12. Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 5 % pada Cleavage Embrio Berbagai Stadia

Ulangan	Jml. Oosit	C l e a v a g e				
		2 sel (%)	4 sel (%)	8 sel (%)	16 sel (%)	Jml.Cleav(%)
1	18	0(0,0)	1(5,56)	4(22,22)	5(27,78)	10(55,56)
2	13	0(0,0)	1(7,69)	3(23,08)	3(23,08)	7(53,85)
3	15	0(0,0)	1(6,67)	3(20,00)	4(26,67)	8(53,33)
4	18	1(5,56)	0(0,0)	4(22,22)	4(22,22)	9(50,00)
5	13	1(7,69)	0(0,0)	3(23,08)	3(23,08)	7(53,85)

Lampiran 13. Data Pengaruh TC-199 yang Ditambahkan Serum Kuda Bunting 10 % pada Cleavage Embrio pada Berbagai Stadia

Ulangan	Jml. Oosit	C l e a v a g e				
		2 sel (%)	4 sel (%)	8 sel (%)	16 sel (%)	Jml.Cleav(%)
1	16	1(6,25)	1(6,25)	3(18,75)	4(25,00)	9(56,25)
2	15	0(0,0)	0(0,0)	4(26,67)	5(33,33)	9(60,00)
3	19	0(0,0)	1(5,26)	6(31,58)	4(21,05)	11(57,89)
4	12	0(0,0)	1(8,33)	3(25,00)	3(25,00)	7(58,33)
5	17	1(5,58)	2(11,76)	3(17,65)	4(23,53)	10(58,82)

Lampiran 14. Transformasi Persentase Cleavage Embrio ke Tabel Arcsin

Ulangan	TC-199(Kontrol)	TC-199 + SKB 5%	TC-199 + SKB 10%
1	39,23	48,20	48,59
2	40,20	47,21	50,77
3	36,70	46,91	49,53
4	43,32	45,00	49,80
5	39,23	47,21	50,09

SELESAI

PAMERAN

01 JUL 2000

Handwritten mark or signature

Handwritten text, possibly "Pameran"

Lampiran 15. Anava Cleavage Embrio Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting

----- ANALYSIS OF VARIANCE -----

HEADER DATA FOR: B:DATA-4 LABEL: Cleavage Embrio Kambing
NUMBER OF CASES: 5 NUMBER OF VARIABLES: 3

ONE-WAY ANOVA

Tingkat Cleavage Embrio Kambing

	GROUP	MEAN	N
	1	39.736	5
	2	46.906	5
	3	49.756	5
	GRAND MEAN	45.466	15

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB.
BETWEEN	266.553	2	133.277	51.868	1.242E-06
WITHIN	30.834	12	2.570		
TOTAL	297.387	14			

Lampiran 16. Uji BNT Cleavage Embrio Kambing antara Kontrol dan Perlakuan Serum Kuda Bunting

Rataan	Perlakuan	Group 1	Group 2	Group 3
39,7600	Group 1			
46,1600	Group 2	*		
49,2320	Group 3	*		

Uji BNT dengan tingkat kemaknaan 0.05. Mean= 1,2274

Group 1 : TC-199 (Kontrol)
Group 2 : TC-199 + Serum Kuda Bunting 5%
Group 3 : TC-199 + Serum Kuda Bunting 10%



