

61 JUL 2003

PAMERAN



SELESAI

LAPORAN PENELITIAN
DIK RUTIN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2001

VIABILITAS OOSIT SAPI SETELAH PROSES VITRIFIKASI DENGAN KRIOPROTEKTAN ETILEN GLIKOL

Peneliti:

RIMAYANTI, drh.

WIDJIATI, M.Si., drh.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Rutin Universitas Airlangga Tahun 2001

SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 5307/JO3/PG/2001

Tanggal 12 Juni 2001

Nomor Urut: 19

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Desember, 2001



LAPORAN PENELITIAN
DIK RUTIN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2001

KKE
KK
571.81
Rim
v

VIABILITAS OOSIT SAPI SETELAH PROSES VITRIFIKASI DENGAN KRIOPROTEKTAN ETILEN GLIKOL

Peneliti:

RIMAYANTI, drh.

WIDJIATI, M.Si., drh.

3000 335 023 141

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Rutin Universitas Airlangga Tahun 2001

SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 5307/JO3/PG/2001

Tanggal 12 Juni 2001

Nomor Urut: 19

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember, 2001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SERANG

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

3000335023141

1.	a. Judul Penelitian	: VIABILITAS OOSIT SAPI SETELAH PROSES VITRIFIKASI DENGAN KRIOPROTEKTAN ETILEN GLIKOL
	b. Macam Penelitian	: () Fundamental (V) Terapan () Pengembangan () Instiusional
	c. Kategori Penelitian	: (V) I () II () III () IV
2.	Kepala Proyek Penelitian	
	a. Nama Lengkap dg. Gelar	: Drh. Rimayanti, M.Kes.
	b. Jenis Kelamin	: Perempuan
	c. Pangkat/Gol. dan NIP	: Penata/Gol.IIIc/131760368
	d. Jabatan sekarang	: Staf Pengajar
	e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Ked.Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
	f. Univ./Inst./Akademi/ Instansi	: Universitas Airlangga
	g. Bidang Ilmu yang Diteliti	: Bioteknologi Reproduksi
3.	Jumlah Tim Peneliti	: 2 (dua) orang
4.	Lokasi Penelitian	: Lab. Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
5.	Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan, sebutkan	
	a. Nama Instansi	: -
	b. Alamat	: -
6.	Jangka Waktu Penelitian	: 4 (empat) bulan
7.	Biaya yang Diperlukan	: Rp. 3.500.000,00
8.	Seminar Hasil Penelitian	
	a. Dilaksanakan tanggal	: 28 Nopember 2001
	b. Hasil Penilaian	: () Baik Sekali (V) Baik () Sedang () Kurang



Mengetahui,
Dekan, Fakultas Kedokteran Hewan
[Signature]
DR. Ismudiono, MS, Drh
NIP. 130 687 297

Mengetahui/ Mengesahkan
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

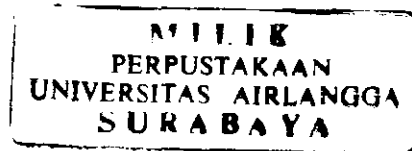
Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., Drh
NIP. 130 701 125

Surabaya,

Ketua Peneliti,

[Signature]

Drh. Rimayanti, M.Kes.
NIP. 131 760 368



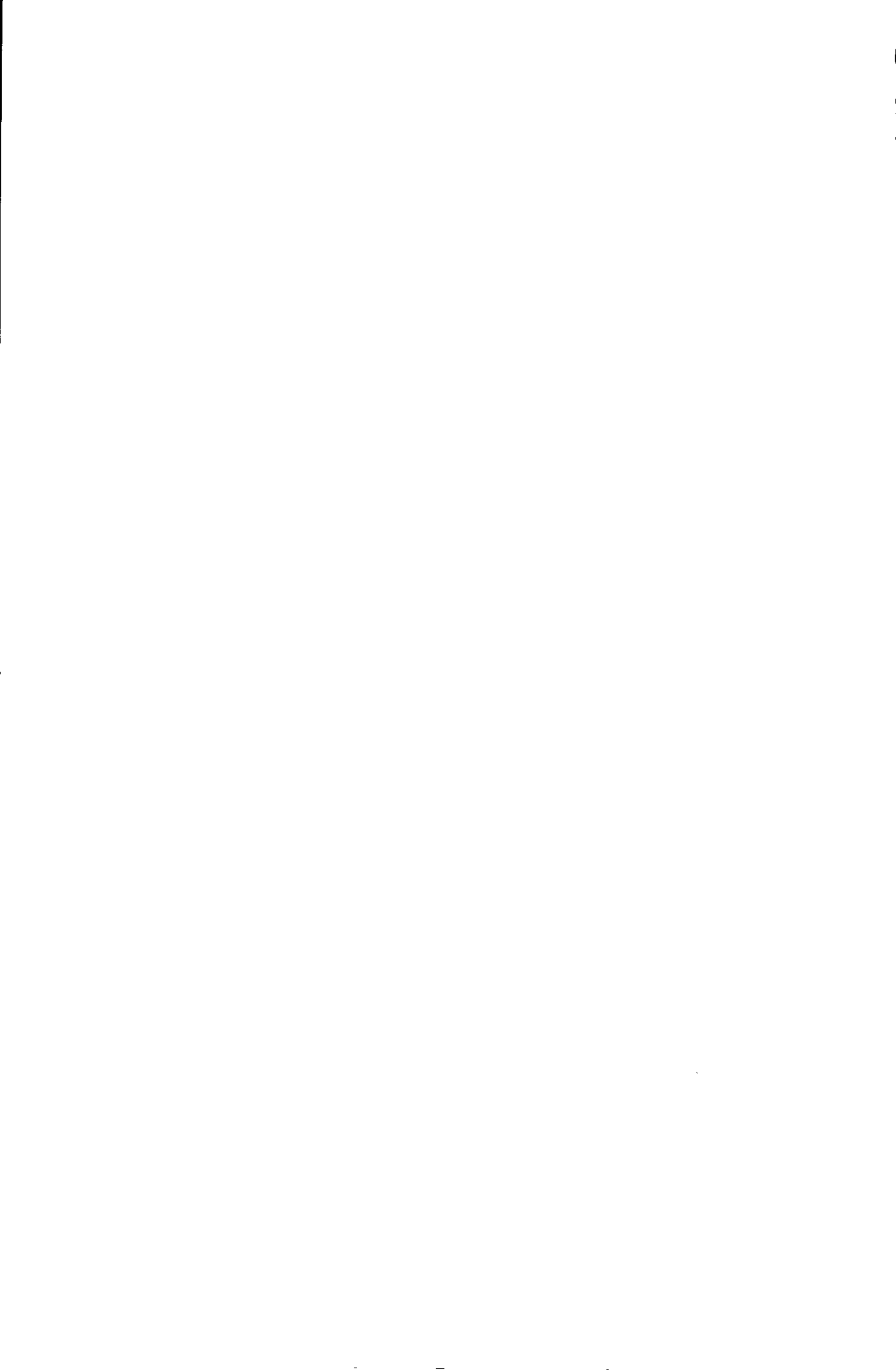


lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit, rata-rata persentase oosit morfologi normal setelah vitrifikasi $92,22 \pm 11,86\%$, $94,27 \pm 11,98\%$, dan $93,02 \pm 7,77\%$. Uji statistik menunjukkan bahwa antara masing-masing lama waktu pemaparan tidak terlihat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Sedangkan kombinasi penggunaan krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit juga tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Rata-rata persentase oosit hidup setelah vitrifikasi, baik dengan menggunakan krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA adalah $75,90 \pm 12,61\%$, $83,65 \pm 14,47\%$. Uji statistik dengan Anava Dua Arah menunjukkan bahwa antara masing-masing krioprotektan tersebut tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Demikian juga dengan lama waktu pemaparan 10, 20, maupun 30 menit sebesar $73,76 \pm 15,48\%$, $83,86 \pm 14,97\%$, $81,71 \pm 10,10\%$. Analisis hasil statistik memperlihatkan bahwa antara masing-masing lama waktu pemaparan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Sementara itu, rata-rata persentase oosit hidup setelah vitrifikasi, akibat kombinasi menggunakan krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

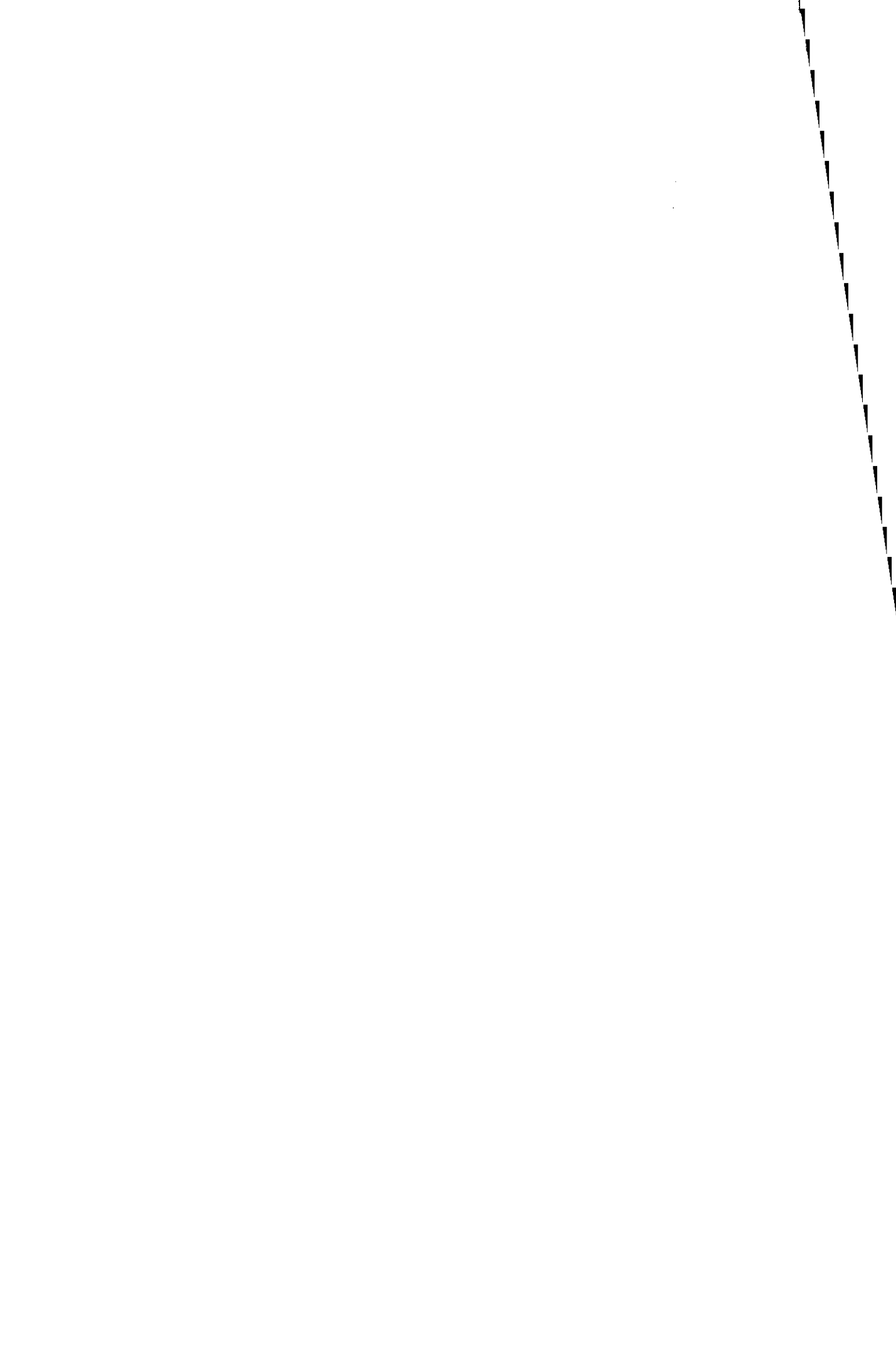
Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa krioprotektan vitrifikasi Etilen Glikol ditambah Sukrosa dapat digunakan dan mempunyai kemampuan yang baik dalam menjaga viabilitas oosit pasca *thawing*. Penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) tidak berpengaruh terhadap kinerja krioprotektan tersebut. Lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi oosit tidak berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca *thawing*. Kombinasi macam krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA dengan lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi oosit tidak berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca *thawing*.

(L.P. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga :
No. Kontrak : 677/JO3.2/PG/2001, 02 Juli 2001)



DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Identitas dan Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Kata Pengantar	v
Daftar Isi	vi
Daftar Tabel	viii
Daftar Gambar	ix
Daftar Lampiran	x
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Pembentukan Oosit dan Folikel	5
2.2. Maturasi Oosit	7
2.3. Kriopreservasi	9
2.4. Vitrifikasi Oosit	13
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	17
3.1. Tujuan Penelitian	17
3.1.1. Tujuan Umum	17
3.1.2. Tujuan khusus	17

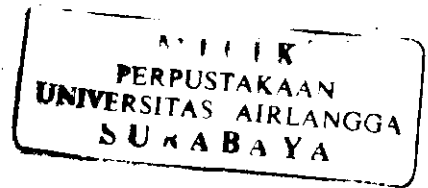


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1. Oosit dengan morfologi normal dan morfologi tidak normal setelah vitrifikasi	34
Gambar 5.2. Oosit hidup dan mati setelah vitrifikasi	35

100

BAB 1
PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Penelitian

Aplikasi bioteknologi bidang peternakan di Indonesia diterapkan dengan mengedepankan salah satu teknologi yang beberapa tahun terakhir ini banyak digunakan untuk meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas ternak, yaitu transfer embrio. Teknologi transfer embrio berkaitan erat dengan fertilisasi *in vitro*, karena fertilisasi *in vitro* digunakan sebagai sarana untuk menghasilkan embrio dengan tingkat efisiensi tinggi, sehingga biaya transfer embrio dapat ditekan menjadi lebih murah

Dalam bidang pengembangan bioteknologi reproduksi khususnya bagi kepentingan dunia peternakan, telah dilakukan berbagai program dan penelitian baik oleh institusi pemerintah maupun swasta yang berkaitan dengan penyediaan embrio. Salah satu cara penyediaan embrio yang telah banyak dilakukan adalah pengawetan dengan metode *freezing* atau pembekuan dengan cara *slow freezing*, *rapid freezing*, dan *ultra rapid freezing*. Namun, saat ini telah dikembangkan pembekuan embrio dengan metode vitrifikasi yang lebih mudah dilakukan dan jauh lebih sederhana. Pada metode vitrifikasi, material yang akan dibekukan ditempatkan

bantu reproduksi pada hewan, keberhasilan pembekuan embrio ini kemudian diikuti dengan berbagai penelitian mengenai kriopreservasi oosit sebagai alternatif penyediaan gamet.

Dari beberapa penelitian tentang pembekuan oosit, diketahui ada bermacam-macam krioprotektan yang dapat digunakan untuk proses vitrifikasi oosit. Namun menurut beberapa peneliti, etilen glikol lebih efektif dibandingkan dengan krioprotektan lain (Otoi *et al.*, 1993 ; Gordon, 1994).

1.2. Rumusan Masalah

Dari pengamatan terhadap viabilitas oosit sapi setelah proses vitrifikasi dengan penambahan sakarida dan protein dalam krioprotektan intraseluler ini timbul permasalahan :

1. Apakah vitrifikasi dengan krioprotektan Etilen Glikol ditambah Sukrosa dan kombinasi Sukrosa + Bovine Serum Albumin (BSA) dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing* ?
2. Apakah lama waktu pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing* ?
3. Apakah kombinasi krioprotektan dan lama waktu pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi berinteraksi mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing* ?



1.3. Hipotesis

Vitrifikasi dengan etilen glikol dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca thawing dan lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca thawing.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pembentukan Oosit dan Folikel

Pada masa perkembangan embrional, apabila kelenjar kelamin berdiferensiasi menjadi ovarium, maka sel benih akan membentuk oogonia. Oogonia akan berproliferasi dengan mengalami pembelahan mitosis hingga terbentuk oosit primer dan proliferasi ini akan berhenti sebelum kelahiran. Segera setelah pembentukannya, oosit primer akan memasuki tahap profase dari pembelahan meiosis I dan sebagian besar akan dikelilingi oleh selapis sel epitel pipih. Sebuah oosit primer dengan sel epitel pipih yang mengelilinginya disebut sebagai folikel primordial (Johnson and Everitt, 1988 ; Ismudiono, 1996).

Pembesaran oosit mengikuti perubahan bentuk sel pada folikel yang semula gepeng menjadi kuboid dan folikel primordial yang telah mengalami perubahan bentuk ini dinamakan folikel primer. Pada saat ini sel folikuler mulai membentuk zona pelusida. Sementara itu perkembangan folikel terus berlangsung, selnya berproliferasi dan membentuk lapisan yang bertambah tebal di sekitar oosit dan zona pelusida, sehingga batasnya menjadi jelas (Johnson and Everitt, 1988).



Selanjutnya menurut Hunter (1995) pertumbuhan oosit akan selalu diikuti oleh pertumbuhan folikel. Rangsangan dari kelenjar hipofisa berupa hormon gonadotropin, yaitu *Follicle Stimulating Hormone* atau FSH akan mendorong berproliferasinya sel granulosa di sekitar oosit sehingga folikel primer akan berubah menjadi folikel sekunder dengan 2 atau lebih lapisan sel granulosa yang mengelilinginya.

Perkembangan folikel selanjutnya adalah terbentuknya rongga folikel (*antrum folliculi*) yang makin membesar dengan cairan folikel di dalamnya. Dengan terbentuknya antrum folikuli ini, maka folikel sekunder selanjutnya dinamakan folikel tersier. Sedangkan folikel tersier yang mengalami pematangan disebut juga sebagai folikel de Graaf (Hardjopranjoto, 1995).

Sebelum terjadinya ovulasi, pembelahan meiosis I dilanjutkan dan menghasilkan oosit sekunder dengan polar bodi I. Menjelang ovulasi, bila sel-sel kumulus terlepas, mulailah terjadi tingkat akhir pendewasaan ovum. Estrogen yang dihasilkan oleh sel teka, akan mendorong membanjirnya *Luteinizing Hormone* atau LH sehingga kadarnya mencapai puncak dan menggertak terjadinya ovulasi. Saat ini pembelahan meiosis II mulai berlangsung segera setelah meiosis I lengkap dan berhenti atau beristirahat kembali pada tahap metafase II sampai terjadinya fertilisasi. Pembentukan badan kutub II terjadi setelah berlangsungnya fertilisasi.

Diameter oosit sapi keseluruhan termasuk zona pelusida adalah 165 μ dengan ketebalan zona pelusida 12–15 μ . Volume sitoplasmanya sedikit, berisi nukleus dan bahan kuning telur yang terbungkus oleh selaput vitelin. Selaput vitelin ini dibungkus dengan sempurna oleh zona pelusida yang tipis dan transparan. Zona pelusida bersifat gelatinous yang memisahkan oosit yang sedang tumbuh dengan sel granulosa di luarnya. Di antara vitelin dengan zona pelusida terdapat ruangan sempit yang berisi cairan disebut *perivitelin space* atau ruang perivitelin (Ismudiono, 1996).

Sel granulosa lain yang mengelilingi dan mendukung oosit adalah sel kumulus ooforus dengan korona radiata sebagai lapisan terdalam. Sel-sel ini berbentuk kubus dan melekat pada zona pelusida melalui beberapa penjurulan sitoplasma. Kumulus ooforus mengelilingi antrum folikuli dan tertata di bawah membrana basalis yang memisahkannya dengan sel teka (Hunter, 1995).

2.2. Maturasi Oosit

Selama persiapan maturasi, oosit merupakan sel besar dengan inti vesikuler atau vesikula germinalis yang relatif besar pula. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), serta Hafez (1993), oosit praovulasi akan mengalami proses diferensiasi yang ditandai dengan adanya perubahan inti atau pematangan inti disertai dengan perubahan sitoplasma atau



pematangan sitoplasma. Oosit akan berkembang menjadi ovum dan dapat dibuahi oleh spermatozoa sehingga memiliki kemampuan perkembangan menjadi embrio. Dengan pemeriksaan mikroskop cahaya, akan terlihat adanya perubahan praovulasi dari oosit - kumulus kompleks. Laufer *et al.* (1984), seperti yang dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) membagi tingkat kematangan oosit berdasarkan penilaian morfologi kompleks oosit-korona radiata-kumulus ooforus. Oosit yang diisolasi dari folikel antral dapat dibagi menjadi :

- a. Oosit yang belum matang (*immature oocyte*) terdiri atas 3 fase :
 - Fase 1 : kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak, oosit tidak jelas.
 - Fase 2 : kompleks dengan kumulus ooforus sedikit, dan korona radiata kompak, oosit tidak jelas.
 - Fase 3 : kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak, oosit tampak samar-samar.
- b. Oosit matang (*mature oocyte*) terbagi atas 2 fase :
 - Fase 4 : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar dan meluas, sedikit berlendir (mucinifikasi), oosit tampak jelas tetapi belum memiliki benda kutub I.
 - Fase 5 : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar, cukup berlendir, oosit tampak jelas dan sudah memiliki benda kutub I (metafase II).

c. *Post mature oocyte* :

Korona radiata lepas, kumulus ooforus yang tampak berlendir sedikit atau sama sekali tanpa kumulus, oosit memiliki benda kutub I (metafase II).

d. *Degenerated oocyte* :

Korona radiata bervariasi, kumulus lepas atau sama sekali tanpa kumulus, dan oosit mengalami degenerasi atau piknosis.

2.3. Kriopreservasi

Mekanisme kriopreservasi merupakan perubahan bentuk fisik timbal balik dari fase cair ke padat (fase beku) dan kembali ke fase cair. Mekanisme fisika kriopreservasi meliputi penurunan suhu dalam keadaan tekanan normal disertai dehidrasi sampai tingkat tertentu dan mencapai suhu jauh di bawah suhu beku (*deepfreezing*), misalnya suhu -196°C . Proses ini harus bersifat reversibel ke kondisi fisiologis awal.

Prinsip tunggal yang terpenting dari kriopreservasi adalah pengeluaran sebagian besar air intraseluler dari sel sebelum membeku (Supriatna dan Pasaribu, 1992), sehingga terjadi penurunan volume air dalam sel, perubahan air menjadi es, dan peningkatan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel. Perubahan ini secara umum disebut *solution effect*. Untuk menghindari terjadinya kristal es intraseluler, harus



diinduksi terbentuknya kristal es ekstraseluler sehingga dapat terjadi proses dehidrasi. Karena osmolaritas cairan di luar sekarang lebih tinggi dari cairan di dalam sel, maka cairan intraseluler akan tertarik ke luar. Jika dehidrasi tidak terjadi, akan terbentuk kristal es berukuran besar intraseluler, dan hal ini dapat merusak sel dengan hebat. Pada keadaan tertentu pengeluaran air yang terlalu banyak juga dapat merusak dan bersifat letal karena sel akan kekeringan. Inilah yang menjadi problem utama pada teknik kriopreservasi. Kerusakan sel juga dapat terjadi sebagai akibat dari peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan menjadi bersifat racun, kerusakan fisik karena terbentuknya kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat, atau terjadinya *osmotic swelling* (Kasai, 1996 ; Wetzels, 1996). Untuk mencapai tujuan proses kriopreservasi perlu dipertahankan sesempurna mungkin sifat-sifat material biologis, terutama viabilitasnya.

Untuk mereduksi pengaruh letal dari proses kriopreservasi sel, perlu dicari suatu krioprotektan yang dapat mempertahankan viabilitas sel setelah proses kriopreservasi. Krioprotektan ini akan bertindak sebagai agen pelindung bagi membrana dan organel sel agar terhindar dari kerusakan integritas sel selama langkah pembekuan dan pencairan kembali.

Krioprotektan yang digunakan dalam proses pembekuan, dibagi menjadi dua, yaitu krioprotektan intraseluler yang biasanya memiliki

ukuran molekul kecil sehingga dapat keluar masuk melalui membran sel dan krioprotektan ekstraseluler yang mempunyai ukuran molekul besar sehingga tidak dapat menembus membran sel. Krioprotektan intraseluler memanfaatkan perbedaan tekanan osmosis dan masuk ke dalam sel untuk membantu memberikan perlindungan terhadap sitoplasma. Sedangkan krioprotektan ekstraseluler menimbulkan kondisi dehidrasi intraseluler akibat perbedaan tekanan osmosis sel, tetapi tanpa masuk ke dalam sel (Hozumi, 2001). Yang biasa dipakai sebagai krioprotektan intraseluler adalah gliserol (gliserin), dimetilsulfoksid (DMSO), etilen glikol, 1,2 propanediol. Sedangkan krioprotektan ekstraseluler yang dapat digunakan adalah polivinil pirolidon (PVP), gula (sukrosa, glukosa, rafinosa), protein dan lipoprotein, kuning telur, serum darah, susu.

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), pada umumnya prosedur kriopreservasi terdiri atas 4 tahapan yang berurutan, yaitu :

- a. Pemaparan krioprotektan (*exposure to cryoprotectant*)
- b. Pembekuan (*cooling*) dan penyimpanan
- c. Pencairan (*warming* atau *thawing*)
- d. Pembilasan krioprotektan (*removal of cryoprotectant*).

Tahapan yang kritis adalah tahap pembekuan dan tahap pencairan kembali. Tahap ini lebih berbahaya dibandingkan dengan pemaparan pada konsentrasi krioprotektan yang tinggi, baik pada tahap penambahan maupun pembilasan krioprotektan. Schellander *et al.* (1994) menunjukkan

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

adanya degenerasi pada sitoplasma setelah tahap pembekuan dan pencairan kembali. Dikatakan bahwa proses pencairan kembali setelah kriopreservasi juga mempunyai peran yang penting terhadap kemampuan hidup kompleks oosit kumulus, karena oosit harus mengalami rehidrasi dan pembilasan krioprotektan.

Beberapa peneliti melakukan berbagai inovasi pada metode pembekuan, seperti yang dicatat oleh Niemann (1991), Supriatna dan Pasaribu (1992), Gordon (1994), dan Wetzels (1996). Ada beberapa metode, diantaranya :

a. *Step by Step Freezing Method* (Metode Pembekuan Bertahap).

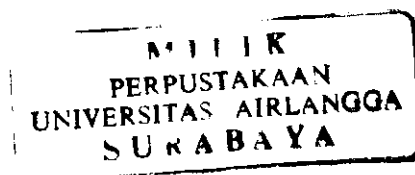
Straw dibekukan secara tiba-tiba dari temperatur dengan ke temperatur 0°C , kemudian -4°C sampai -7°C . Pembekuan dilanjutkan ke suhu -35°C , kemudian dicelupkan ke dalam nitrogen cair.

b. *Two Step Freezing Method* (Metode Pembekuan Dua Tahap).

Dari temperatur ruangan *straw* langsung ditempatkan pada *plunging temperature* selama 10 menit, baru kemudian dimasukkan ke dalam nitrogen cair.

c. *Rapid freezing Method*

Straw ditempatkan pada suhu ruangan atau pada 4°C , kemudian didinginkan dalam kabut nitrogen cair. Setelah itu, *straw* langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair.





d. *Ultrarapid Freezing Method*

Straw ditempatkan pada 4°C, kemudian langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair.

e. Vitrifikasi

Straw langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair.

2.4. Vitrifikasi Oosit

Metode kriopreservasi yang banyak mendapatkan perhatian belakangan ini adalah vitrifikasi. Dibandingkan dengan metode pembekuan yang konvensional, vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang efisien karena jauh lebih sederhana, lebih mudah dilakukan, lebih murah karena tidak menggunakan peralatan canggih yang terlalu mahal, dan tidak memerlukan waktu tertentu dalam proses pembekuannya (Schiewe, *et al.*, 1991). Bagi kepentingan di dunia kedokteran hewan dan peternakan, diperlukan suatu metode yang praktis dan aplikatif di lapangan, sehingga metode vitrifikasi ini dapat dijadikan sebagai alternatif.

Sebagai pengganti proses dehidrasi perlahan pada prosedur pembekuan yang konvensional, material yang akan dibekukan dengan vitrifikasi ditempatkan dalam media hiperosmolaritas atau krioprotektan berkonsentrasi tinggi. Setelah material dicelupkan langsung ke dalam



Belakangan ini ditemukan teknik baru dengan menarik *straw* sehingga mengecil, memanjang, dan dindingnya menipis (Vajta *et al.*, 1998). Meskipun demikian, Yang *et al.* (2000), masih meragukan efek yang menguntungkan dari teknik ini.



Hasil penelitian ini diharapkan juga dapat dijadikan sebagai salah satu model penyediaan dan penyimpanan oosit bagi program fertilisasi *in vitro* pada manusia, utamanya yang berkaitan dengan penghematan biaya IVF dan tersedianya sel oosit bila terjadi kegagalan pada program IVF.

Disamping itu, informasi ilmiah yang diperoleh dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya perkembangan ilmu pengetahuan di bidang bioteknologi reproduksi, khususnya tentang vitrifikasi oosit dan berpeluang untuk publikasi nasional maupun internasional.



- d. Krioprotektan etilen glikol (*p.a. Merck*), sukrosa, BSA.
- e. Nitrogen cair, zat pewarna propidium iodide (*Sigma Co. USA*), parafin padat, kapas, kertas tisu, alumunium foil.

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah termos kecil, *refrigerator*, bilik steril, alat suntik *disposable* mikropipet (*eppendrop*), pipet pasteur (Germany), pinset, skalpel, gunting, cawan petri dengan ukuran 35 mm (*Nunc, Nunclon, Kamstrup*) dan 65 mm, *millipore* dengan ukuran filter 0,2 μm (*Whatman, England*), gelas baker, gelas erlen meyer, *waterbath*, inkubator CO_2 , *ministraw*, kontainer pembeku, *vacuum jar*, gelas obyek dan gelas penutup, mikroskop invert, mikroskop fluoresen.

4.3. Metode Penelitian

4.3.1. Koleksi Ovarium, Aspirasi, dan Pengamatan Oosit

Sampel ovarium dari Rumah Potong Hewan (RPH) dicuci sebanyak 2-3 kali dengan larutan garam fisiologik bersuhu 38°C , kemudian dilakukan aspirasi menggunakan semprit (alat suntik) ukuran 18 Gauge diisi dengan 1-1,5 ml media PBS.

Cairan aspirasi dituang dari tabung reaksi ke dalam cawan petri diameter 90 mm, kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Oosit dimasukkan ke dalam cawan petri kecil berdiameter 35 mm yang berisi media PBS+ untuk dicuci sebanyak 3 kali, kemudian dicuci kembali dalam



TCM 199 sebanyak 3 kali. Selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop dan diambil oosit belum matang (*immature oocyte*) yang berada pada fase 3 yaitu oosit kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak, oosit tampak samar-samar (Laufer *et al.*, (1984). Kemudian, pada oosit ini akan dilakukan proses untuk maturasi *in vitro*.

4.3.2. Maturasi Oosit *In Vitro*

Setelah dicuci dalam medium TCM 199 3 kali berturut-turut, kemudian oosit dipindahkan ke dalam medium maturasi TCM 199 yang diberi BSA 3%, FSH 0,01 mg/ml, LH 5 µg/ml, dan gentamisin sulfat 50 µg/ml. Kemudian oosit dimaturasi selama 22 jam dalam inkubator mengandung 5% CO₂ dengan suhu 38,5°C. Oosit yang telah mengalami maturasi ini diamati tahap pematangannya dengan pewarnaan aceto orcein.

Oosit yang matang berada pada fase 5 seperti yang diklasifikasikan oleh Laufer *et al.* (1984), seperti dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992). Terlihat oosit kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata longgar, cukup berlendir, oosit tampak jelas, dan sudah memiliki benda kutub I, pertanda sudah memasuki tahap metafase II.

4.3.3. Proses Vitrifikasi Oosit

Setelah dilakukan maturasi selama 22 jam, oosit yang matang ini dipindahkan ke cawan petri yang berisi medium vitrifikasi 40% EG + 0,3M S



Kelompok 4. Krioprotektan EG+S+BSA waktu pemaparan 10 menit

Kelompok 5. Krioprotektan EG+S+BSA waktu pemaparan 20 menit

Kelompok 6. Krioprotektan EG+S+BSA waktu pemaparan 30 menit

Ulangan dilakukan 4 kali. Masing-masing kelompok perlakuan ditempatkan ke dalam *ministraw*, dengan jumlah 6 - 16 oosit/ *ministraw*. Persentase oosit dengan morfologi normal dan oosit hidup dikalkulasi dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah oosit dengan morfologi normal}}{\text{Jumlah oosit yang divitrifikasi}} \times 100\%$$

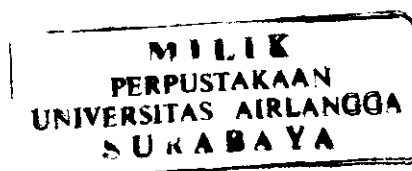
$$\frac{\text{Jumlah oosit hidup}}{\text{Jumlah oosit yang divitrifikasi}} \times 100\%$$

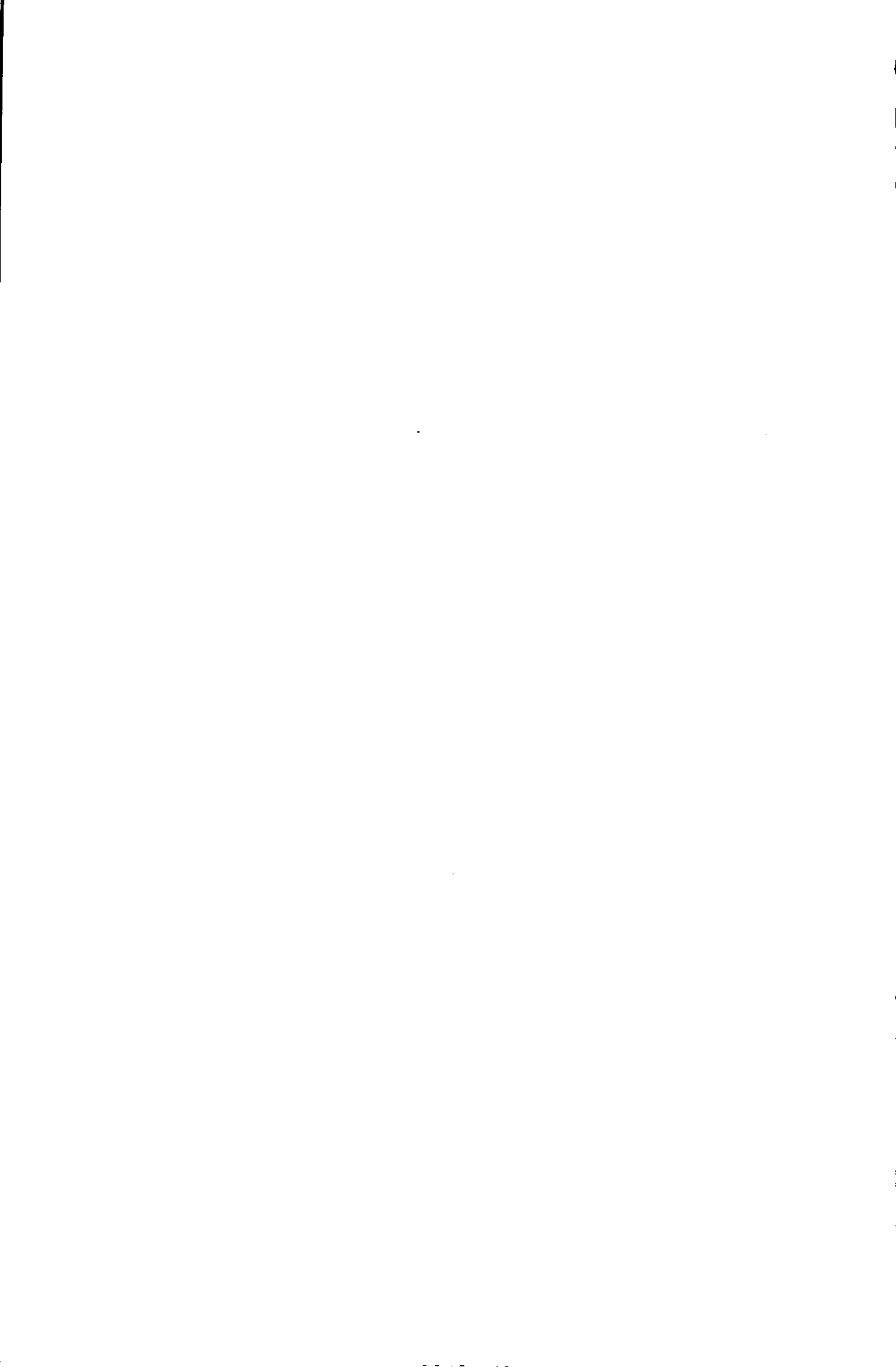
4.3.5. Pencairan Kembali (*Thawing*) dan Pembilasan Krioprotektan

Setelah dibekukan 2-4 minggu, dilakukan pencairan kembali dengan memasukkan *ministraw* ke dalam penangas air 30°C. Oosit yang telah dikeluarkan dari *ministraw* dibilas 2 x dengan sukrosa 0,5 M seperti prosedur yang dilakukan oleh Sun *et al.* (1995).

4.3.6. Pemeriksaan Morfologi Oosit dengan Mikroskop Invert

Oosit diperiksa di bawah mikroskop invert untuk diamati morfologinya dengan pembesaran 200 x dan 400 x. Kualitas ditentukan berdasarkan penilaian morfologis normal sebagai berikut : plasma membran





BAB 5

HASIL dan PEMBAHASAN

5.1. Oosit dengan Morfologi Normal

Persentase oosit morfologi normal setelah vitrifikasi menggunakan krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tertera pada tabel-tabel berikut ini :

Tabel 5.1. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit morfologi normal setelah vitrifikasi dengan krioprotektan EG+S ; EG+S+BSA

Krioprotektan	% Oosit dengan Morfologi Normal ($\bar{x} \pm SD$)
EG+S	91,04 [*] \pm 11,31
EG+S+BSA	95,30 [*] \pm 9,11

Nilai rata-rata pada kolom sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Rata-rata persentase oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi menggunakan krioprotektan EG+S dan EG+S+BSA adalah 91,04 \pm 11,31% dan 95,30 \pm 9,11%. Setelah dianalisis dengan uji statistik Anava Dua Arah, maka dapat ditunjukkan bahwa antara



masing-masing krioprotektan tersebut tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Pada penelitian ini digunakan campuran 40% Etilen glikol (EG) ditambah dengan 0,3 M Sukrosa (S) dibandingkan dengan EG + S + Bovine Serum Albumin (BSA) yang ternyata tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Sehingga dapat dikatakan bahwa kedua formulasi krioprotektan tersebut dapat digunakan dan etilen glikol mempunyai kemampuan yang baik dalam menjaga kondisi morfologi normal oosit sapi selama proses vitrifikasi.

Menurut laporan Gordon (1994), beberapa tahun terakhir ini, EG efektif digunakan sebagai krioprotektan untuk kriopreservasi embrio dan diaplikasikan pula pada kriopreservasi oosit. Berat molekul EG yang rendah (62,07) memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi. Beberapa peneliti juga mengatakan bahwa kelebihan EG sebagai krioprotektan adalah karena toksisitasnya yang rendah.

Penambahan 6% Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro tidak memperlihatkan adanya pengaruh terhadap morfologi normal oosit ($P > 0,05$), baik antara EG+S maupun EG+S+BSA. Supriatna dan Pasaribu (1992) menegaskan bahwa meskipun serum atau BSA merupakan komponen baku medium pupukan, terutama karena BSA berguna untuk viabilitas embrio *in vitro*, namun secara



umum nilai BSA sebagai krioprotektan ekstraseluler dapat diabaikan dan tingkat kegunaannya dalam proses pembekuan tidak jelas, sehingga dapat dikatakan bahwa untuk proses vitrifikasi oosit sapi tidak diperlukan BSA sebagai tambahan makromolekul.

Tabel 5.2. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit morfologi normal setelah vitrifikasi dengan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Lama Waktu Pemaparan (menit)	% Oosit dengan Morfologi Normal ($\bar{x} \pm$ SD)
10	92,22 * \pm 11,86
20	94,27 * \pm 11,98
30	93,02 * \pm 7,77

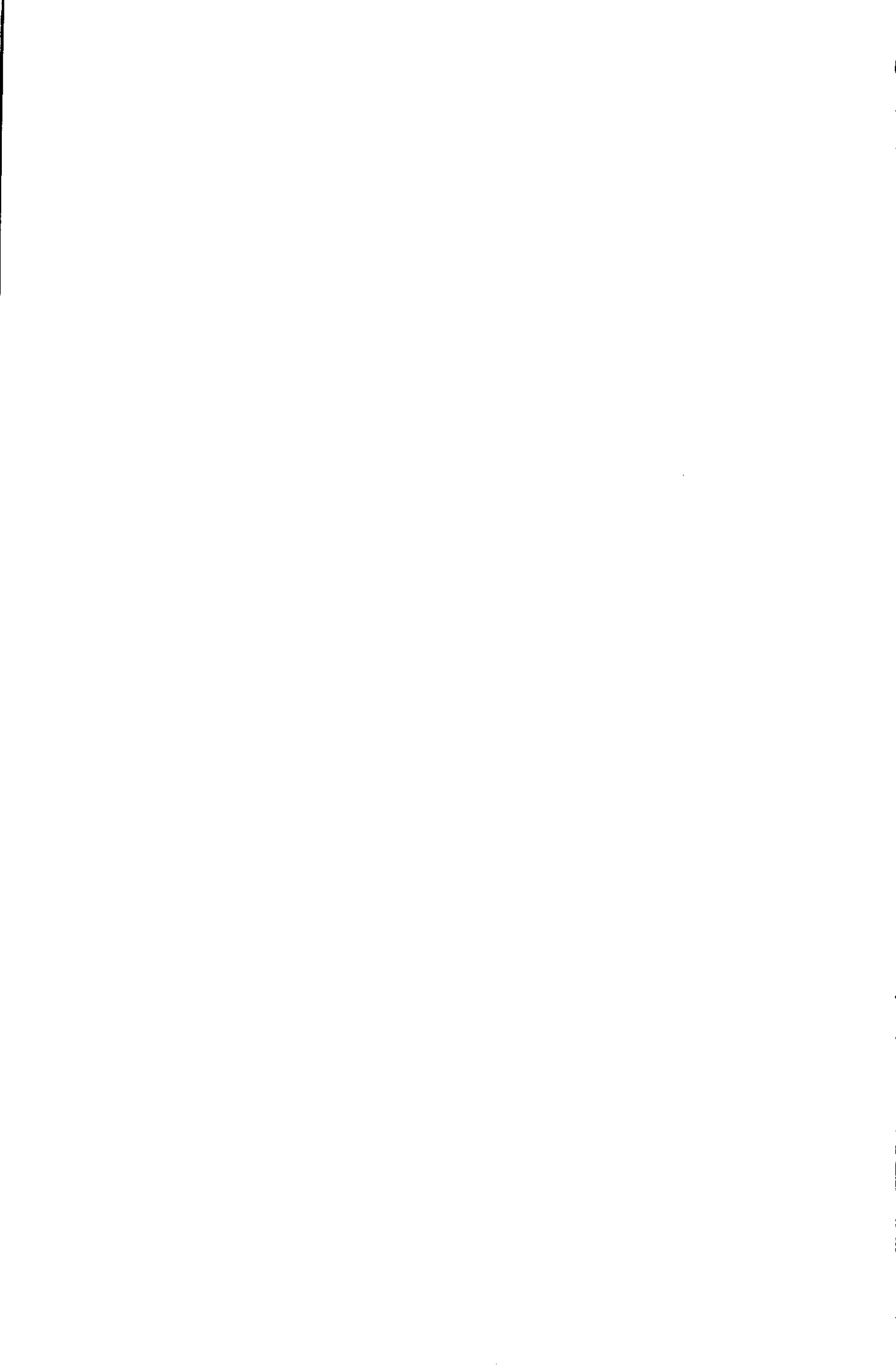
Nilai rata-rata pada kolom sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Rata-rata persentase oosit morfologi normal setelah vitrifikasi, dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit adalah $92,22 \pm 11,86\%$, $94,27 \pm 11,98\%$, dan $93,02 \pm 7,77\%$. Analisis dengan Anava Dua Arah memperlihatkan bahwa antara masing-masing lama waktu pemaparan, yaitu 10 menit tidak berbeda dengan 20 dan 30 menit, demikian juga dengan lama waktu pemaparan 20 menit dan 30 menit, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).



Hasil penelitian menunjukkan oosit tetap viabel. Menurut Kasai (1996), kendala utama pada vitrifikasi adalah toksisitas dari krioprotektan. Strategi untuk menghindari toksisitas media vitrifikasi adalah dengan memperpendek lama waktu pemaparan. Tetapi sebaliknya, apabila waktu pemaparan terlalu cepat, peresapan krioprotektan juga belum cukup, dan kristal es intraseluler dapat terbentuk, sekalipun tidak ada kristal es ekstraseluler. Bagaimanapun juga, waktu pemaparan yang optimal demi suksesnya vitrifikasi harus dikompromikan antara menghindari kerusakan sel karena efek toksik krioprotektan dan menghindari terbentuknya kristal es intraseluler.

Pada beberapa penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, terlihat adanya perbedaan hasil penelitian yang dilakukan antara satu peneliti dengan peneliti yang lain. Dhali *et al.* (2000) mengemukakan bahwa waktu pemaparan 3 menit dapat digunakan untuk vitrifikasi oosit kerbau, sedangkan Rayos *et al.* (1994), melaporkan bahwa waktu pemaparan 10, 20, 40 menit memberikan hasil yang baik terhadap morfologi oosit tikus dibandingkan dengan waktu pemaparan 5 menit sebelum dilakukan *quick freezing*. Sementara itu, Otoi *et al.* (1998) menunjukkan hasil yang berbeda. Pada kriopreservasi oosit sapi yang matang dengan metode vitrifikasi, antara waktu pemaparan 1 menit, 5 menit, dan 10 menit tidak menampakkan perbedaan yang signifikan.



Tabel 5.3. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit morfologi normal setelah vitrifikasi dengan kombinasi krioprotektan EG+S ; EG+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)		
	10	20	30
EG+S	91,25 ^a \pm 11,81	88,54 ^a \pm 15,73	93,33 ^a \pm 8,17
EG+S+BSA	93,18 ^a \pm 13,64	100,00 ^a \pm 0,00	92,71 ^a \pm 8,59

Nilai rata-rata pada baris dan kolom sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Dari tabel 5.3. diketahui rata-rata persentase oosit morfologi normal setelah vitrifikasi pada masing-masing kelompok perlakuan yang menggunakan kombinasi krioprotektan EG+S, EG+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Hal ini menunjukkan bahwa macam krioprotektan tidak berinteraksi dengan lama waktu pemaparan, karena masing-masing mempunyai pengaruh yang berdiri sendiri terhadap kondisi normal dan tidaknya morfologi oosit. Dikatakan oleh Nowshari *et al.* (1994) bahwa waktu pemaparan, konsentrasi krioprotektan, dan prosedur pencairan kembali mempengaruhi normalitas morfologi dan



Metode vitrifikasi dapat memberikan kontribusi untuk meningkatkan kemampuan hidup dan kapasitas berkembang sel oosit. Hasil penelitian ini (tabel 5.4.) ternyata menunjukkan bahwa kedua macam krioprotektan berkonsentrasi tinggi ini dapat mempertahankan daya hidup oosit sapi setelah proses vitrifikasi dan pencairan kembali. Berarti problem utama yang berkaitan dengan toksisitas krioprotektan dapat diatasi dengan menggunakan kedua formulasi krioprotektan ini. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Otoi *et al.* (1998), daya hidup oosit sapi pada tahap metafase II setelah vitrifikasi, dengan 40 dan 50% EG lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 20 dan 30% EG. Demikian pula dengan kesempatan membelah dan berkembang ke tahap blastosis, lebih tinggi pada 40% EG.

Penambahan 6% Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro juga tidak memperlihatkan adanya pengaruh terhadap daya hidup oosit ($P > 0,05$). Hal ini didukung oleh pernyataan Pugh *et al.* (1994) dalam penelitiannya yang membuktikan bahwa penambahan BSA tidak memberikan pengaruh terhadap daya hidup embrio pada fase morula dan blastula.



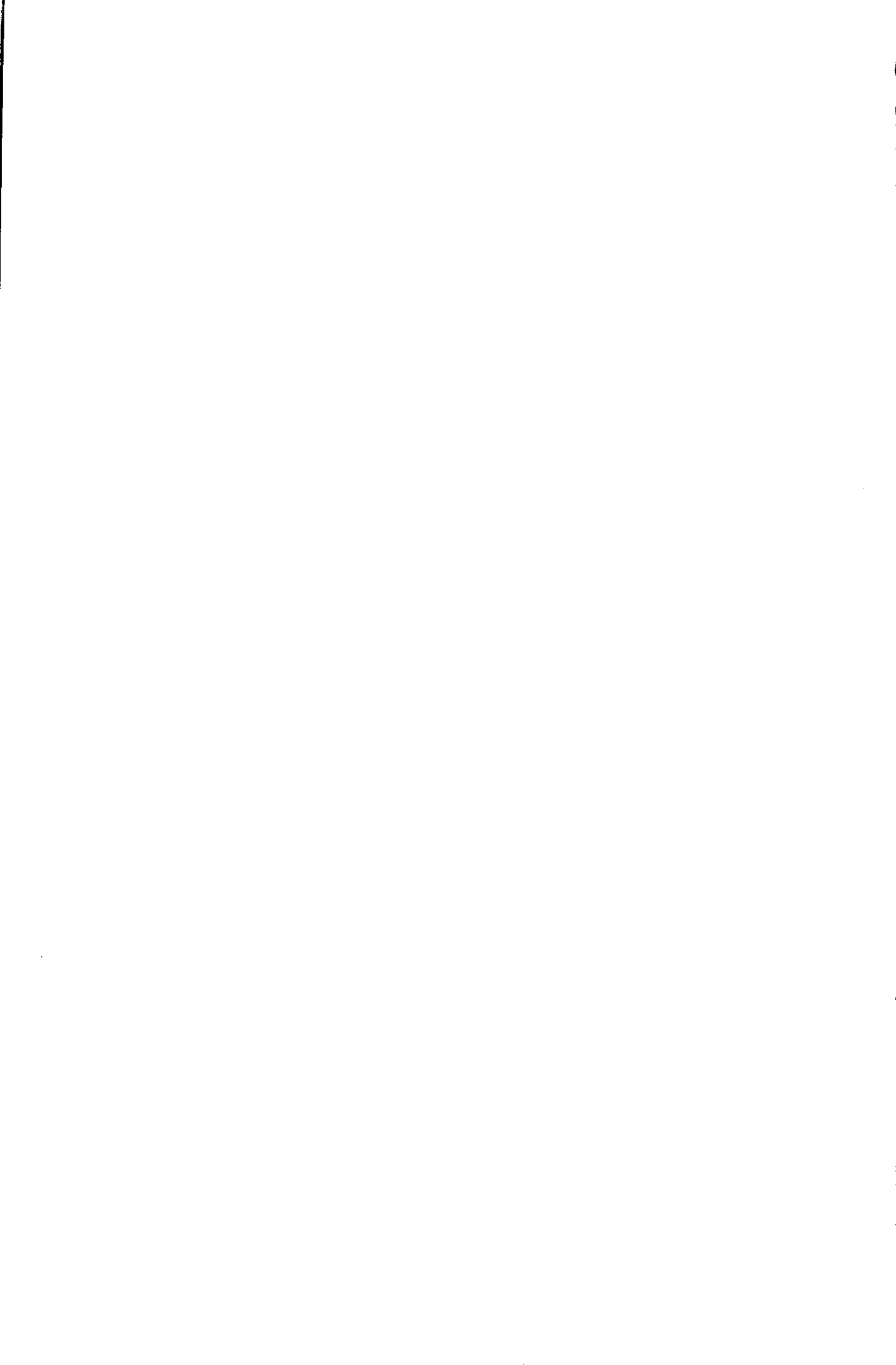
Tabel 5.5. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Lama Waktu Pemaparan (menit)	% Oosit Hidup ($\bar{x} \pm$ SD)
10	73,76 ^a \pm 15,48
20	83,86 ^a \pm 14,97
30	81,71 ^a \pm 10,10

Nilai rata-rata pada kolom sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Analisis hasil statistik memperlihatkan bahwa antara masing-masing lama waktu pemaparan, yaitu 10 menit tidak berbeda dengan 20 dan 30 menit, demikian juga dengan lama waktu pemaparan 20 menit dan 30 menit, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Dikatakan oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) bahwa perlu waktu yang cukup untuk pemaparan krioprotektan agar dapat tercapai keseimbangan kimiawi di dalam sel. Penelitian yang dilakukan, memberikan hasil yang tidak berbeda antara 10, 20, dan 30 menit. Mungkin dapat dipilih lama waktu pemaparan 10 menit untuk mengawali proses vitrifikasi, karena dengan memperpendek lama



waktu pemaparan oosit akan terhindar dari efek toksik dan waktu 10 menit cukup untuk memberikan kesempatan peresapan krioprotektan.

Tabel 5.6. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan krioprotektan EG+S ; EG+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)		
	10	20	30
EG+S	67,92 ^a \pm 13,15	80,21 ^a \pm 16,45	79,58 ^a \pm 3,43
EG+S+BSA	79,61 ^a \pm 17,18	87,50 ^a \pm 14,73	83,84 ^a \pm 14,64

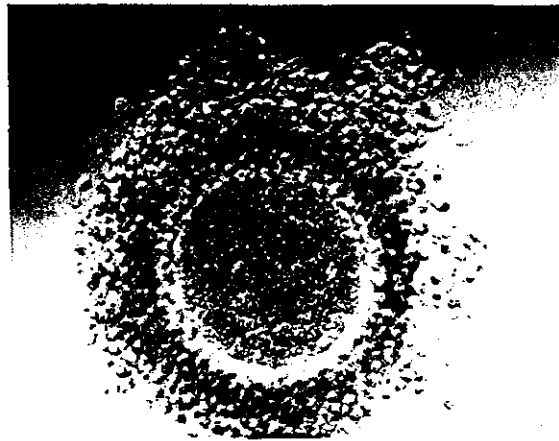
Nilai rata-rata pada baris dan kolom sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Tabel 5.6. memperlihatkan bahwa persentase rasio oosit hidup akibat kombinasi macam krioprotektan dengan lama waktu pemaparan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Diungkapkan oleh Nowshari *et al.* (1994) bahwa waktu pemaparan, konsentrasi krioprotektan, dan prosedur pencairan kembali mempengaruhi kemampuan fertilitas dari oosit dan perkembangan sampai pada tahap blastosis.

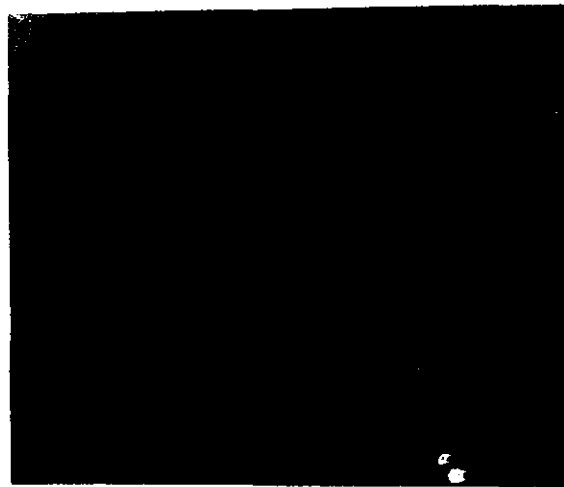


5.4. Hasil Pengamatan Mikroskopis

Hasil pengamatan mikroskopis terhadap morfologi dan hidup-mati oosit setelah proses vitrifikasi, diperlihatkan pada gambar berikut ini :



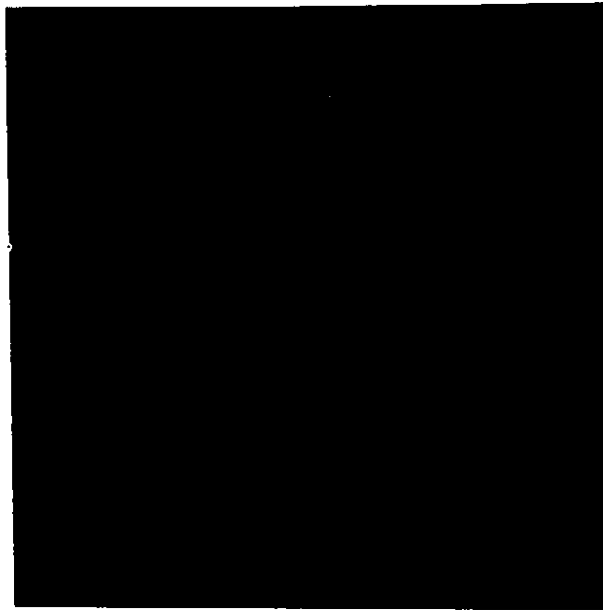
a



b

Gambar 5.1. Oosit dengan morfologi normal (a) dan morfologi tidak normal (b) setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop invert





a



b

Gambar 5.2. Oosit hidup (a) dan mati (b) setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop fluoresen

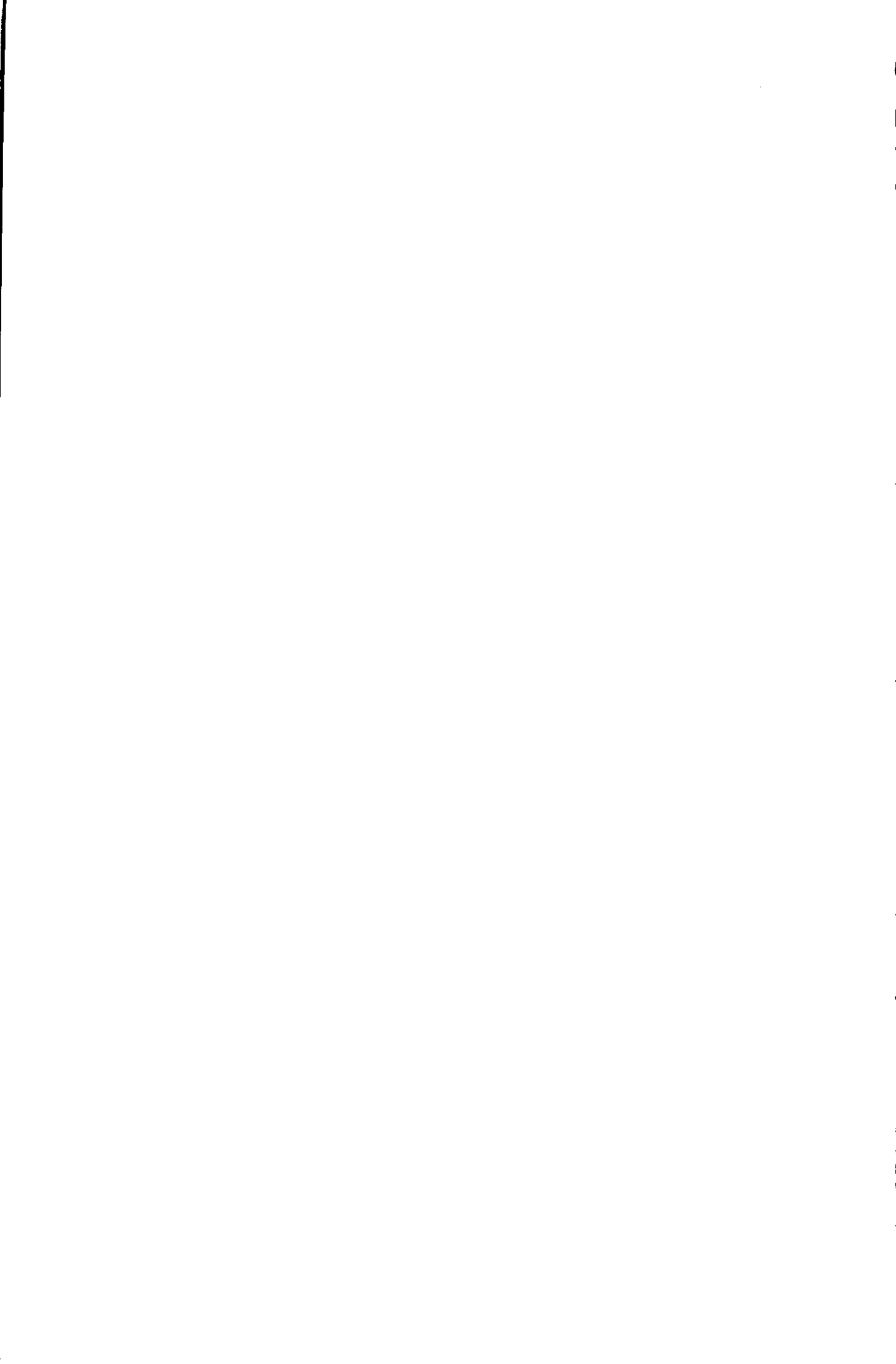


pemaparan krioprotektan 10 menit, untuk mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.

2. Metode vitrifikasi dapat digunakan sebagai metode untuk kriopreservasi oosit.



- Annual Conference the Australian Society of Reproductive Biology Inc. p. 32.
- Naitana, S., P. Loi, S. Ledda, P. Cappai, M. Dattena, L. Bogliolo, and G. Leoni. 1996. Effects of Biopsy and Vitrification on In Vitro Survival of Ovine Embryos at Different Stages of Development. *Theriogenology* 46 : 813-824.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of Ova and Embryos from Livestock : Current Status and Research Needs. *Theriogenology* 35 : 109-124.
- Nowshari, M.A., P.L. Nayudu, and J.K. Hodges. 1994. Effect of Cryoprotectant Concentration, Equilibration Time and Thawing Procedure on Survival and Development of Rapid Frozen-Thawed Mature Mouse Oocytes. *Theriogenology* 42 : 1193-1204.
- Otoi, T., S. Tachikawa, S. Kondo, and T. Suzuki. 1993. Developmental Capacity of Bovine Oocytes Frozen in Different Cryoprotectants. *Theriogenology* 40 : 801-807.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa, and T. Suzuki. 1998. Cryopreservation of Mature Bovine by Vitrification in Straws. *Cryobiology* 37 : 77-85.
- Pugh, P.A, A.E.L. Ankersmit, L.T. McGowan, and H.R. Tervit. 1994. Effect of Protein Type and Concentration in the Freezing Medium on the Survival of IVF Bovine Embryos. *Proceedings of the Twenty-sixth Annual Conference the Australian Society of Reproductive Biology Inc.* p. 30.
- Rayos, A.A., Y. Takashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1994. Quick Freezing of Unfertilized Mouse Oocytes Using Ethylene Glycol with



- Wetzels, A.M.M. 1996. Cryopreservation/Theory. In: M. Bras et al. (editor).
IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization. N.V. Organon,
Netherlands. pp. 244.
- Yang, B.C., B.S. Yang, H.H. Seong, G.S. Im, S.J. Park, W.K. Chang, L.C.
Cheong, and K.S. Im. 2000. Effects of Vitrification Methods and
Polyvinylpyrrolidone Supplementation on the Viability of Immature
Bovine Oocytes. *Theriogenology* 53 : 266.



Lampiran 2. Statistik Diskriptif dan Univariate Analysis of Variance Oosit Morfologi Normal setelah Vitrifikasi dengan Krioprotektan EG + S: EG + S + BSA dan Lama Waktu Pemaparan

Between-Subjects Factors

	N
1 = 10 menit; 2 = 1	8
20 menit; 3 = 30 menit	8
3	8
1 = EG + S; 2 =	12
EG + S + BSA	12

Descriptive Statistics

Dependent Variable: NORMAL

1 = 10 menit; 2 = 20	1 = EG + S; 2 =	Mean	Std. Deviation	N
1	1	70.3900	14.1636	4
	2	82.1250	15.7500	4
	Total	76.2575	15.2195	8
2	1	76.0150	17.2049	4
	2	90.0000	.0000	4
	Total	83.0075	13.5182	8
3	1	79.3600	12.5029	4
	2	78.7950	13.0135	4
	Total	79.0775	11.8181	8
Total	1	75.2550	13.8931	12
	2	83.6400	11.7439	12
	Total	79.4475	13.2897	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NORMAL

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Intercept	Hypothesis	151485.726	1	151485.726
	Error	421.849	1	421.849 ^a
WAKTU	Hypothesis	183.893	2	91.946
	Error	245.370	2	122.685 ^b
KRIOPROT	Hypothesis	421.849	1	421.849
	Error	245.370	2	122.685 ^b
WAKTU * KRIOPROT	Hypothesis	245.370	2	122.685
	Error	3211.065	18	178.393 ^c



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NORMAL

Source		F	Sig.
Intercept	Hypothesis	359.099	.034
	Error		
WAKTU	Hypothesis	.749	.572
	Error		
KRIOPROT	Hypothesis	3.438	.205
	Error		
WAKTU * KRIOPROT	Hypothesis	.688	.515
	Error		

- a. MS(KRIOPROT)
- b. MS(WAKTU * KRIOPROT)
- c. MS(Error)



Lampiran 3. Statistik Diskriptif dan Univariate Analysis of Variance Oosit Hidup setelah Vitrifikasi dengan Krioprotektan EG + S, EG + S + BSA dan Lama Waktu Pemaparan

Between-Subjects Factors

	N
1 = 10 menit; 2 = 20 menit; 3 = 30 menit	8
1 = EG + S; 2 = EG + S + BSA	12

Descriptive Statistics

Dependent Variable: HIDMAT

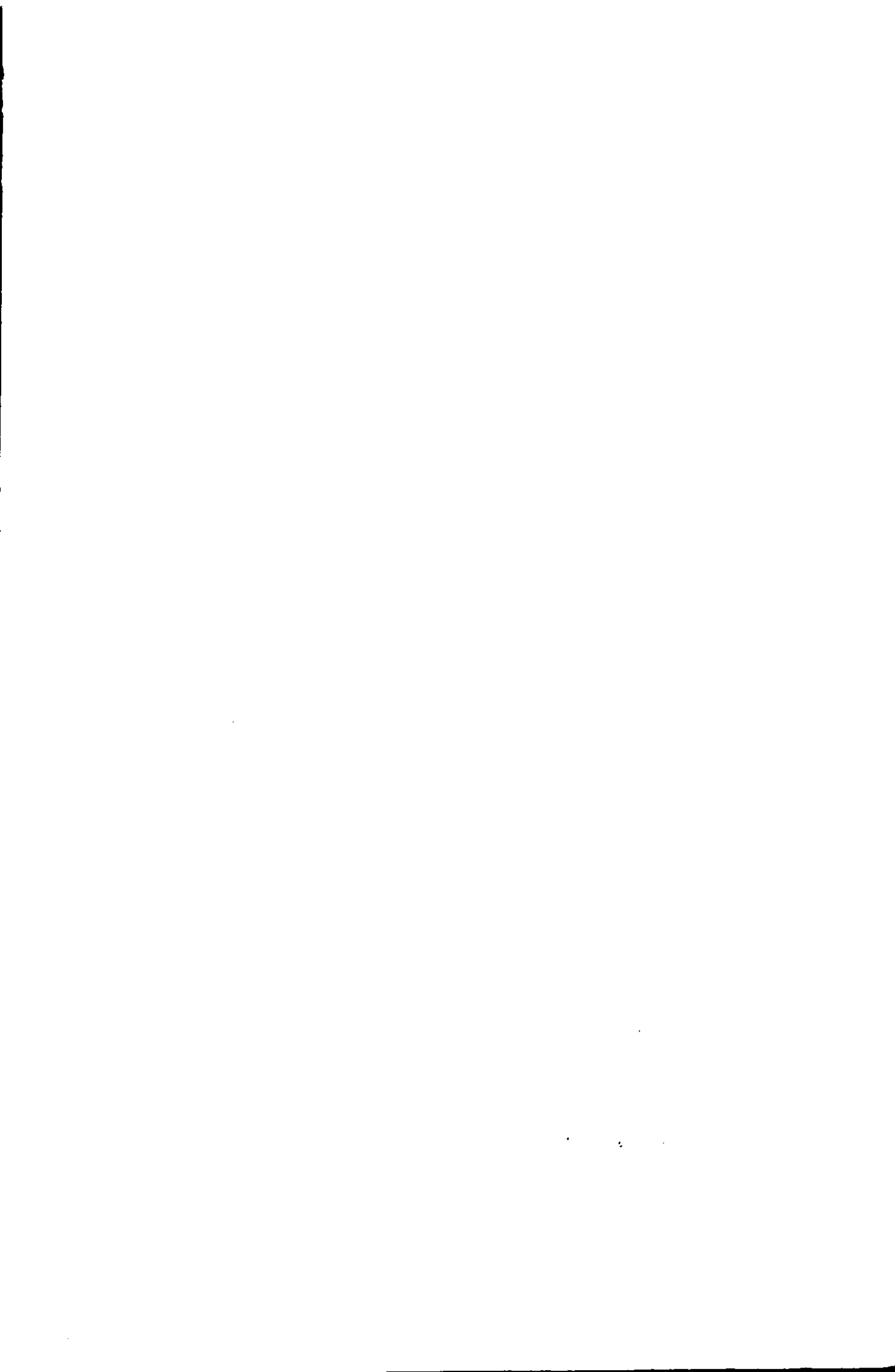
1 = 10 menit; 2 = 20	1 = EG + S; 2 =	Mean	Std. Deviation	N
1	1	67.0500	15.7107	4
	2	66.7625	16.9808	4
	Total	66.9063	15.1454	8
2	1	67.2050	16.6709	4
	2	75.0275	17.3981	4
	Total	71.1162	16.3192	8
3	1	70.6900	15.3573	4
	2	69.7725	15.3164	4
	Total	70.2313	14.2076	8
Total	1	68.3150	14.5091	12
	2	70.5208	15.4240	12
	Total	69.4179	14.6877	24

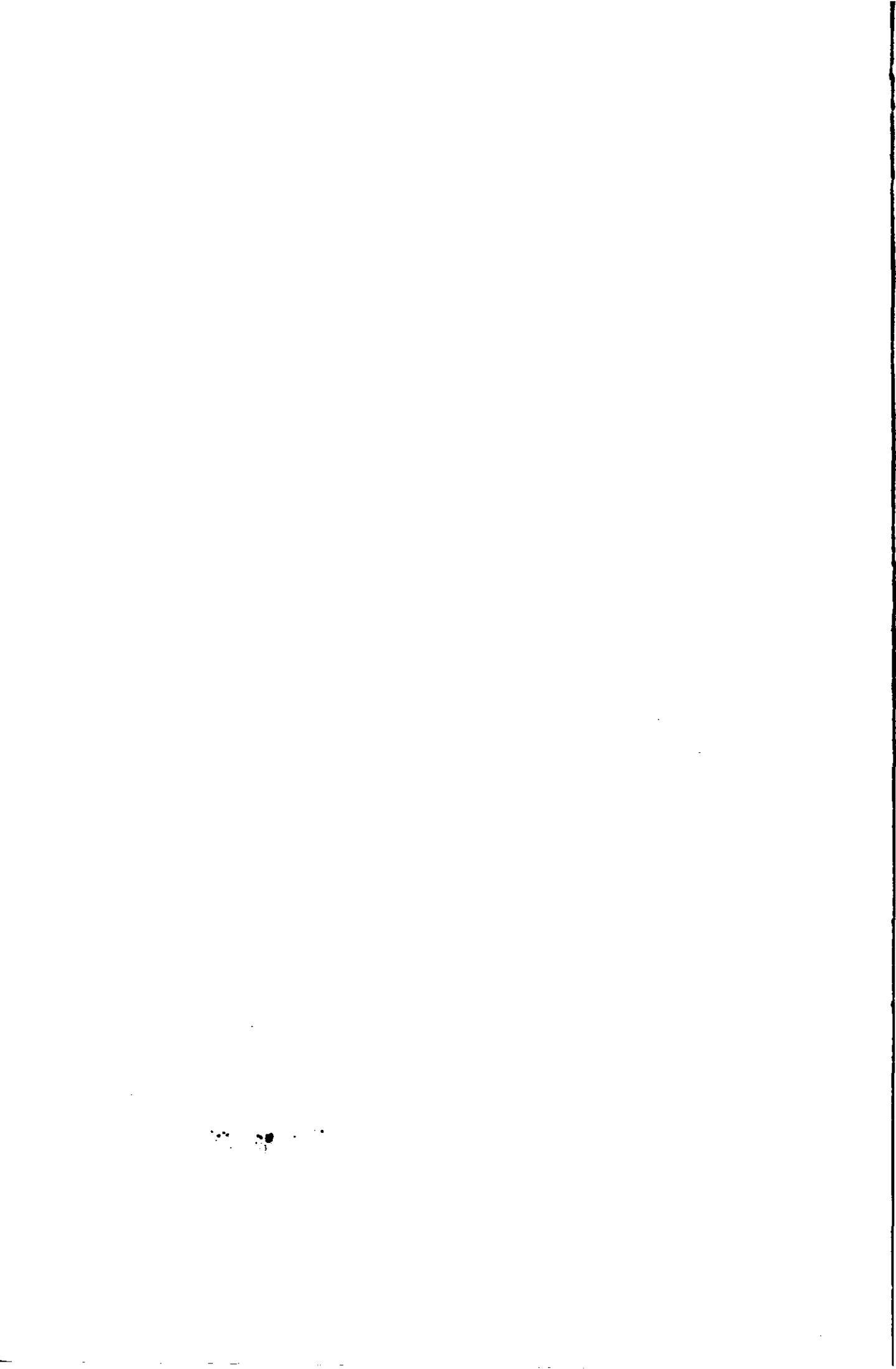
Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HIDMAT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Intercept	115652.332	1	115652.332
WAKTU	78.835	2	39.417
KRIOPROT	29.194	1	29.194
WAKTU * KRIOPROT	95.038	2	47.519
	4758.677	18	264.371 ^c







Lampiran 4. Medium Vitrifikasi/ Kriprotektan

Etilen Glikol (p.a. Merck®)

Nama lain	: Ethandiol
Rumus kimia	: $C_2H_6O_2$
Berat Molekul	: 62,07 g/mol
Berat jenis	: 1,11 kg/l

Medium vitrifikasi :

40% Etilen Glikol	= 40 ml EG + 60 ml PBS
Sukrosa 0,3 M	= $0,3 \times 342,3$ (BM Sukrosa)
	= 102,69 g/1 liter PBS
	= 10,269 g/ 100 ml PBS
BSA 6%	= 6 g/ 100 ml PBS

Lampiran 5. Medium Pembilasan Kriprotektan

Sukrosa 0,5 M	= $0,5 \times 342,3$ (BM Sukrosa)
	= 171,15 g/1 liter PBS
	= 17,115 g/ 100 ml PBS

- 1 JUL 2003

TAMERAN

JK
571.81
Rim
v.

TKC

Viabilitas Cosit sapi setelah
proses vitrifikasi dengan ...
in semi

No. MHS.	NAMA PEMINJAM	Tgl. Kembali

.....
: Sepuluh ribu rupiah
: BEBAS PINJAM.
Surabaya,
Penerima,
1981

.....
na dari :
: Sepuluh ribu rupiah
: BEBAS PINJAM.
Surabaya,
Penerima,
1981

BI

