

1. Oocyte Test.

2. REPRODUCTION TECHNIQUES.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KK
TKR 08/01
Rim
✓

TESIS

VIABILITAS OOSIT SAPI
SETELAH PROSES VITRIFIKASI
DENGAN KRIOPROTEKTAN YANG BERBEDA
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



RIMAYANTI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Surabaya
2001

Lembar Pengesahan

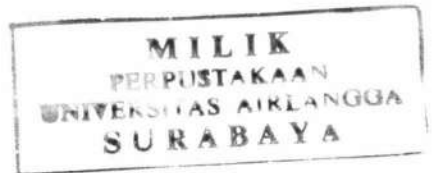
TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 20 APRIL 2001

Oleh

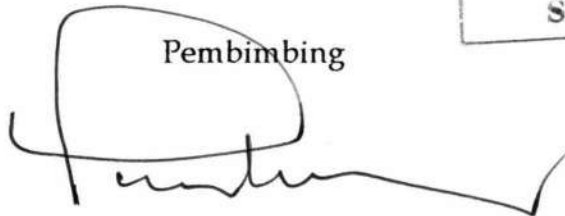
Pembimbing Ketua



dr. Aucky Hinting, Ph.D
NIP. 130873509



Pembimbing



Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc., Drh.
NIP. 130189851

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



dr. Aucky Hinting, Ph.D
NIP. 130873509

Telah diuji pada
Tanggal 20 April 2001

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. dr. A. Marlinata

Anggota : 1. dr. Aucky Hinting, Ph.D
2. Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc., Drh.
3. Mas'ud Hariadi, Drh., M.Phill., Ph.D
4. Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., Drh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan yang sangat berharga ini, saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala rahmat, hidayah, dan karunia tak terhingga yang telah dilimpahkan kepada saya, sehingga penulisan tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat, saya menyampaikan terimakasih kepada dr. Aucky Hinting, Ph.D selaku pembimbing utama dan Prof. DR. H. Soehartojo Hardjopranjoto, M.Sc, Drh. selaku pembimbing kedua yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan petunjuk dan bimbingan kepada saya hingga selesainya penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini saya juga menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

- Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan finansial untuk menjalani pendidikan Program Pascasarjana.
- Rektor Universitas Airlangga, Prof. dr. H. Soedarto, DTMH, Ph.D., dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, DR. Ismudiono, MS., Drh. atas ijin dan kesempatan yang telah diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan program Magister.

- Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. DR. H. M. Amin, dr. yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Pogram Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, dr. Aucky Hinting, Ph.D yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama mengikuti pendidikan program Magister.
- Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, DR. H. Fasich, Apt. beserta staf, atas pemberian fasilitas laboratorium selama penelitian di Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Ketua Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Prof. DR. Yoes Prijatna Dahlan, M.Sc., dr. beserta staf, atas pemberian fasilitas laboratorium selama penelitian ini berlangsung.
- Penguji proposal dan tesis, yaitu Prof. dr. A. Marlinata, Mas'ud Hariadi, Drh., M.Phill., Ph.D., serta Prof. DR. H. Sarmanu, MS., Drh. yang telah meluangkan waktu menguji, menilai, dan memberi masukan yang berharga terhadap tesis ini.
- Sejawat Widjiati, MS., Drh. atas ketulusannya memberikan motivasi dan membantu selama pelaksanaan penelitian di laboratorium.

- Bambang Prayogo, MS., Drs., Apt. dan DR. Mulja Hadi Santosa, Apt., atas bantuan dan fasilitas penelitian yang diberikan.
- Para sejawat di Laboratorium Ilmu Kemajiran yang turut memotivasi selama mengikuti pendidikan.
- Teman-teman seangkatan peserta Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi. Terimakasih atas semangat yang diberikan dan suasana belajar yang penuh keakraban selama pendidikan.
- Teman-teman kerabat kerja TVRI Surabaya. Terima kasih atas dukungan dan persahabatan yang terjalin selama ini.

Pada kesempatan yang sangat baik ini, saya juga menghaturkan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga kepada orang tua saya, Ayahanda H. Karsono dan Ibunda (Alm.) Hj. Siti Chairani yang dengan segala jerih payah membesarkan, menanamkan Iman dan Taqwa, serta mendidik saya dalam menghadapi tantangan kehidupan, dengan tulus ikhlas berdoa dan memberikan semangat selama saya menempuh pendidikan. Semoga arwah almarhumah Ibunda yang belum sempat melihat saya berhasil menyelesaikan pendidikan Magister, mendapatkan tempat yang baik di sisi Allah SWT, sesuai amal dan ibadahnya. Juga kepada Ayah dan Ibu mertua, terimakasih atas doa restu dan dorongan semangat kepada saya selama ini.

Akhirnya dengan teramat tulus saya sampaikan pula ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada yang tercinta suami saya, Drs. M. Irmansyah dan anak-anak saya, Andradiani Aristy, Adeliadiani Destyanti, dan Rama Perwira Irnanda, atas segala dukungan moral dan material, kesabaran, pengertian, dan pengorbanan yang demikian besar selama saya menempuh pendidikan dan menyelesaikan tesis.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu saya selama ini.

RINGKASAN

RIMAYANTI. Viabilitas Oosit Sapi setelah Proses Vitrifikasi dengan Krioprotektan yang Berbeda (di bawah bimbingan dr. Aucky Hinting, Ph.D dan Prof. DR. H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc., Drh.).

Metode vitrifikasi merupakan alternatif kriopreservasi oosit yang terus diteliti dan dikembangkan karena tekniknya lebih efisien, lebih murah, lebih sederhana dan mudah untuk dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat keberhasilan metode vitrifikasi serta mengetahui macam krioprotektan dan lama waktu pemaparan krioprotektan yang paling sesuai untuk proses vitrifikasi oosit, sehingga bermanfaat untuk kepentingan pengembangan bioteknologi di dunia peternakan dan sebagai model kriopreservasi oosit bagi program *IVF* pada manusia.

Penelitian ini menggunakan krioprotektan 40% Etilen Glikol + 0,3M Sukrosa (EG+S) ; 40% Etilen Glikol + 0,3M Sukrosa + 6% Bovine Serum Albumin (EG+S+BSA) ; 40% 1,2 Propanediol + 0,3M S (PROH+S) ; 40% PROH + 0,3M S + 6% BSA (PROH+S+BSA), sebagai medium vitrifikasi. Sebagai sampel digunakan oosit sapi hasil aspirasi oosit dari ovarium yang berasal dari RPH Pegirian Surabaya dan telah mengalami maturasi *in vitro*. Sebanyak 366 oosit hasil maturasi *in vitro* ini mendapatkan 12 perlakuan dalam 4 macam krioprotektan dengan lama waktu pemaparan 10, 20, 30 menit pada suhu ruangan. Masing-masing kelompok perlakuan ini ditempatkan ke dalam *ministraw* yang sudah dilakukan *OPS (Open Pulled Straw)*, dan langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Setelah dibekukan selama 2-4 minggu, dilakukan *thawing* atau pencairan kembali dalam penangas air 30°C, kemudian pembilasan krioprotektan 2 x dengan 0,5 M sukrosa, dan diamati di bawah mikroskop.

Parameter yang diukur adalah persentase oosit dengan morfologi normal dan persentase oosit hidup. Penilaian morfologis normal menggunakan mikroskop invert berdasarkan pada plasma membran yang intak, ooplasma bergranulasi homogen, zona pelusida dan ooplasma berbatas jelas. Sedangkan penilaian terhadap oosit yang hidup berdasarkan pada pengamatan di bawah mikroskop fluoresen dengan pewarnaan propidium iodide. Gambaran yang terlihat adalah bila oosit hidup, ooplasmanya tidak akan menyerap warna (putih) dan bila oosit mati, ooplasmanya berwarna merah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi, baik dengan menggunakan krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, maupun PROH+S+BSA adalah $91,04 \pm 11,31\%$, $95,30 \pm 9,11\%$, $93,68 \pm 8,16\%$, dan $93,15 \pm 8,35\%$. Setelah diuji

dengan Anava Dua Arah, ternyata tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) antara masing-masing krioprotektan. Demikian juga dengan perlakuan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit, rata-rata persentase oosit morfologi normal setelah vitrifikasi $95,48 \pm 9,10\%$, $91,47 \pm 10,27\%$, dan $92,93 \pm 8,06\%$. Uji statistik menunjukkan bahwa antara masing-masing lama waktu pemaparan tidak terlihat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Sedangkan kombinasi penggunaan krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+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, EG+S+BSA, PROH+S, maupun PROH+S+BSA adalah $75,90 \pm 12,61\%$, $83,65 \pm 14,47\%$, $86,38 \pm 14,77\%$, dan $80,25 \pm 18,14\%$. 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 $77,75 \pm 16,04\%$, $83,68 \pm 16,66\%$, $83,21 \pm 12,74\%$. 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, EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+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 atau 1,2 Propanediol yang masing-masing ditambah Sukrosa dapat digunakan dan mempunyai kemampuan yang sama-sama baik dalam menjaga viabilitas oosit pasca *thawing*. Penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) tidak berpengaruh terhadap kinerja kedua 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, EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+S+BSA dengan lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi oosit tidak berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca *thawing*.

ABSTRACT

Viability of bovine oocytes after vitrification using different cryoprotectants was studied in 366 mature oocytes. Oocytes were exposed to 10, 20, and 30 minutes to a vitrification solution consisting of (1). 40% Etylene Glycol + 0,3M Sucrose, (2). 40% Etylene Glicol + 0,3M Sucrose + 6% Bovine Serum Albumin, (3). 40% 1,2 Propanediol + 0,3M Sucrose, (4). 40% 1,2 Propanediol + 0,3M Sucrose + 6% Bovine Serum Albumin. Oocytes were kept in Open Pulled Straw, and then plunged into liquid nitrogen rapidly. After 2-4 weeks, the frozen oocytes were thawed in a 30°C water bath and washed twice in 0,5 M Sucrose. Viability of oocytes was examined morphologically using inverted microscope and their life using fluorescent microscope. There were no significant differences ($p > 0,05$) for normal morphological oocytes among treatment EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, and PROH+S+BSA groups (91,04%, 95,30%, 93,68%, and 93,15% respectively), and their life (75,90%, 83,65%, 86,38%, and 80,25% respectively). There were no significant differences ($p > 0,05$) in the normal morphological oocytes among treatment of exposure time 10, 20, and 30 minutes (95,48%, 91,47%, and 92,93% respectively), and oocytes life (77,75%, 83,68%, and 83,21% respectively). Combination of cryoprotectants and exposure time also did not differ significantly ($p > 0,05$) in the normal morphological and the oocytes life. It is concluded that EG and PROH combination with Sucrose have similar ability to oocytes viability after vitrification. The use of BSA did not contribute a beneficial effect for bovine oocytes vitrification.

Key words : viability, bovine, oocytes, vitrification, cryoprotectants.

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi	i
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Lampiran	vii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Pembentukan Oosit dan Folikel	8
2.2. Karakteristik Komponen Oosit	11
2.3. Maturasi Oosit	14
2.3.1. Maturasi <i>In Vitro</i>	18
2.4. Kriopreservasi	19
2.4.1. Metode Kriopreservasi	24
2.5. Vitrifikasi	28
2.6. Kriopreservasi Oosit dengan Teknik Vitrifikasi	30

BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	39
3.1.	Kerangka Konseptual Penelitian	39
3.2.	Hipotesis Penelitian	43
BAB 4	METODE PENELITIAN	44
4.1.	Rancangan Penelitian	44
4.2.	Sampel Penelitian	44
4.3.	Variabel Penelitian	45
4.3.1.	Klasifikasi Variabel	45
4.3.2.	Definisi Operasional Variabel	46
4.4.	Bahan Penelitian	47
4.5.	Alat Penelitian	48
4.6.	Lokasi dan Waktu Penelitian	49
4.7.	Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data	49
4.7.1.	Koleksi Ovarium dari Rumah Potong Hewan	49
4.7.2.	Aspirasi dan Pengamatan Oosit	50
4.7.3.	Maturasi Oosit <i>In Vitro</i>	52
4.7.4.	Proses Vitrifikasi Oosit	54
4.7.5.	Pembagian Kelompok Perlakuan	56
4.7.6.	Pencairan Kembali (Thawing) Krioprotektan	57
4.7.7.	Pembilasan Krioprotektan	58
4.7.8.	Pemeriksaan Morfologi Oosit dengan Mikroskop Invert	58

	4.7.9. Pemeriksaan Hidup-Mati Oosit dengan Mikroskop Fluoresen	59
	4.8. Analisis Data	59
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	60
	5.1. Persentase Oosit dengan Morfologi Normal	60
	5.2. Persentase Oosit Hidup	63
	5.3. Hasil Pengamatan Mikroskopis	66
BAB 6	PEMBAHASAN	70
	6.1. Oosit dengan Morfologi Normal	71
	6.1.1. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)	71
	6.1.2. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	74
	6.1.3. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	76
	6.2. Oosit Hidup	77
	6.2.1. Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)	77

6.2.2.	Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	79
6.2.3.	Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	80
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	84
7.1.	Kesimpulan	84
7.2.	Saran	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN	93

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Faktor-faktor penyebab kerusakan seluler dan kematian pada sistem biologis akibat proses pembekuan	23
Tabel 5.1. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan yang berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)	60
Tabel 5.2. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	61
Tabel 5.3. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan kombinasi macam krioprotektan (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	62
Tabel 5.4. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan yang berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)	63
Tabel 5.5. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	64
Tabel 5.6. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan kombinasi macam krioprotektan (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan lama waktu pemaparan yang berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)	65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Ultra dari komponen-komponen oosit ..	14
Gambar 2.2. Oosit matang	17
Gambar 2.3. Berbagai bentuk oosit yang mengalami degenerasi	17
Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual	41
Gambar 3.2. Skema Kerangka Operasional Penelitian	42
Gambar 4.1. Diagram proses pencucian dan pematangan oosit	52
Gambar 4.2. Skema pengemasan oosit dalam <i>straw</i> untuk proses Vitrifikasi	55
Gambar 5.1. Oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi	66
Gambar 5.2. Beberapa bentuk oosit yang mengalami degenerasi setelah proses vitrifikasi	67
Gambar 5.3. Oosit dengan morfologi normal dan hidup setelah vitrifikasi	68
Gambar 5.4. Oosit dengan morfologi normal tetapi mati setelah vitrifikasi	68
Gambar 5.5. Oosit dengan morfologi tidak normal tetapi hidup setelah vitrifikasi	69
Gambar 5.6. Oosit dengan morfologi tidak normal tetapi mati setelah vitrifikasi	69

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data jumlah oosit dengan hasil pengamatan oosit morfologi normal pada perlakuan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	93
Lampiran 2. Persentase oosit dengan morfologi setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	94
Lampiran 3. Daftar Anava persentase oosit dengan morfologi normal setelah ditransformasikan ke tabel Arcus Sinus	95
Lampiran 4. Statistik deskriptif dan Univariate Analysis of Variance oosit morfologi normal setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	96
Lampiran 5. Data jumlah oosit dengan hasil pengamatan oosit hidup pada perlakuan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	100

Lampiran 6.	Persentase oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	101
Lampiran 7.	Daftar Anava persentase hidup setelah ditransformasikan ke tabel Arcus Sinus	102
Lampiran 8.	Statistik deskriptif dan Univariate Analysis of Variance oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan yang 10, 20, dan 30 menit	103
Lampiran 9.	Medium Koleksi Ovarium	107
Lampiran 10.	Medium Aspirasi Oosit	107
Lampiran 11.	Medium Maturasi/ Pematangan	108
Lampiran 12.	Medium Vitrifikasi/ Krioprotektan	109
Lampiran 13.	Medium Pembilasan Krioprotektan	110

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Penelitian

Pengembangan bidang peternakan secara global semakin jauh melibatkan aplikasi ilmu pengetahuan dan teknologi. Di Indonesia, usaha peternakan yang bersifat tradisional, kini tampak banyak mengenal dan menerapkan kemajuan teknologi yang dirasakan bermanfaat dan lebih menguntungkan.

Aplikasi bioteknologi bidang peternakan di Indonesia sudah menjadi bagian dari program pemerintah. Pemerintah mengeluarkan kebijakan agar bioteknologi di bidang pertanian mendapatkan prioritas utama dalam pengembangannya dan sosialisasi dari kemajuan teknologi ini perlu diinformasikan untuk semakin meningkatkan pengetahuan petani peternak (Sukra, 1995). Kebijakan mengenai bioteknologi di bidang pertanian ini 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. Apalagi teknik fertilisasi *in vitro* dapat memanfaatkan material alat kelamin hewan betina yang cukup banyak terbuang sebagai hasil ikutan di Rumah Potong Hewan (RPH) untuk penyediaan sel telur atau oosit. Hasil ikutan RPH ini lebih mudah diperoleh dan pemanfaatannya akan menekan biaya dibandingkan bila dilakukan aspirasi oosit langsung dari induk. Dari ovarium ternak betina yang dipotong di RPH akan didapatkan antara 10 sampai 25 oosit per satu ekor ternak betina yang dipotong (LIPI, 1994).

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. Pembekuan embrio dapat dilakukan 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 dalam media hiperosmolaritas atau krioprotektan berkonsentrasi tinggi. Setelah itu

material langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair sehingga larutan yang beku ini seolah-olah menjadi seperti kaca.

Bagi dunia peternakan, untuk proses pembekuan embrio diperlukan suatu metode yang praktis dan aplikatif di lapangan. Dengan demikian pembekuan embrio dengan vitrifikasi dapat menjadi suatu alternatif. Proses kriopreservasi yang dilakukan menjadi lebih efisien, lebih sederhana, dan lebih murah karena tidak diperlukan waktu yang lama dalam prosedur pembekuannya, disamping tidak menggunakan peralatan mahal seperti pada metode pembekuan yang telah dilakukan sebelumnya. Secara teknis, metode ini dapat memperkecil kerusakan sel embrio akibat kristal es ekstraseluler, seperti yang dikatakan oleh Kasai (1996) bahwa setelah dilakukan pengamatan terhadap embrio dari beberapa spesies, metode vitrifikasi dapat mengurangi kerusakan akibat pembekuan karena suhu kritis dapat dilampaui dengan sangat cepat.

Dalam program bayi tabung (*In Vitro Fertilization* - IVF) pada manusia, kriopreservasi embrio telah banyak dilakukan dengan tingkat keberhasilan yang memuaskan. Namun ternyata embrio yang dibekukan menciptakan problem baru, karena pembekuan embrio dianggap tidak etis dan dilarang di beberapa negara (Gordon, 1994 ; Wetzel, 1996). Pada tahun-tahun terakhir ini, penelitian lebih diarahkan pada pembekuan oosit sebagai alternatif pengganti pengawetan embrio. Demikian juga

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

Penelitian tentang pembekuan oosit yang dilakukan oleh Gook *et al.* (1993) yang dikutip oleh Gordon (1994) melaporkan bahwa hanya terjadi 5 kehamilan dari transfer embrio pada manusia setelah penggunaan metode pembekuan oosit ini, karena proses pembekuan akan menyebabkan terjadinya depolimerisasi mikrotubulus dan menghilangnya *microtubule organizing centres* di oosit. Pada fase metafase II, terlihat kerusakan pada spindel mikrotubulus. Setelah mengetahui adanya kerusakan sel akibat terbentuknya kristal es ekstraseluler, oleh Rall dan Fahy (1985) seperti yang dikutip oleh Leibo *et al.* (1996) perlu dipikirkan penggunaan metode vitrifikasi karena tingkat efisiensinya tinggi dan terhindar dari pembentukan kristal-kristal es.

Dari beberapa penelitian tentang pembekuan oosit, diketahui ada bermacam-macam krioprotektan yang dapat digunakan untuk proses vitrifikasi oosit. Namun menurut beberapa peneliti, etilen glikol atau 1,2 propanediol lebih efektif dibandingkan dengan krioprotektan lain (Hochi *et al.*, 1995 ; Otoi *et al.*, 1992, 1993 ; Gordon, 1994). Sedangkan penelitian dengan menambahkan protein dan sakarida sebagai bahan osmotik yang bersifat *non permeating* pada pembekuan oosit belum menghasilkan

formulasi krioprotektan yang tepat dalam mempertahankan atau menambah viabilitas oosit setelah vitrifikasi.

Berangkat dari permasalahan di atas, penelitian mengenai viabilitas oosit sapi setelah proses vitrifikasi dengan krioprotektan yang berbeda ini dilakukan baik untuk kepentingan pengembangan bioteknologi di dunia peternakan dan kedokteran hewan, maupun sebagai model bagi kriopreservasi oosit demi menghindari aspek legal dan etika bagi kepentingan program IVF pada manusia.

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 atau 1,2 Propanediol yang masing-masing 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 macam krioprotektan dan lama waktu pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi berinteraksi mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian mengenai viabilitas oosit setelah proses vitrifikasi dengan krioprotektan yang berbeda ini dilakukan untuk mengetahui tingkat keberhasilan metode vitrifikasi sebagai salah satu cara pembekuan oosit.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini dilakukan untuk mencari krioprotektan yang paling sesuai bagi metode vitrifikasi oosit dan untuk mengetahui waktu pemaparan krioprotektan yang paling sesuai dalam proses vitrifikasi oosit.

1.4. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui tingkat keberhasilan metode vitrifikasi pada oosit sapi ini, diharapkan dapat dikembangkan kriopreservasi oosit

dengan teknik yang praktis dan efisien sebagai alternatif penyediaan gamet pada pengembangan bidang bioteknologi reproduksi, baik pada hewan maupun manusia.

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.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

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).

Pada tikus, *guinea pig*, sapi, domba, kambing, kerbau, dan manusia, semua oosit primer telah menyelesaikan tahap profase pada pembelahan meiosis I saat menjelang lahir. Proses pembelahan ini tidak langsung memasuki tahap metafase melainkan beralih ke fase diaktioten yang merupakan masa istirahat selama tahap profase dan fase ini dipertahankan hingga menjelang ovulasi (Baker, 1982).

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).

Hunter (1995) telah menceritakan tentang pertumbuhan folikel pada ovarium bahwa selama pertumbuhan folikel, terjadi dua proses yang penting bagi produksi gamet betina. Pertama, terbentuknya membran tambahan tersusun dari bahan mukopolisakarida yang dibentuk di sekeliling oosit sebagai akibat adanya kegiatan sintetik oosit itu sendiri bersama sel folikel. Membran itu dikenal dengan nama zona pelusida. Sekresi dari zona pelusida pada awalnya berupa kumpulan bahan fibril, sehingga membentuk zona secara lengkap. Jadi zona terbentuk jauh sebelum oosit mencapai dewasa dalam folikel de Graaf. Kedua, terjadinya pertumbuhan oosit menjadi dewasa akibat kemampuan sintesis yang dimilikinya, dan bahan makanan oosit yang berasal dari sel somatik di sekelilingnya.

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, yaitu dengan terlihatnya gelembung kecil berisi cairan yang menonjol pada permukaan ovarium. Folikel tersier atau folikel de Graaf juga dikelilingi 2 lapis sel yang lain yaitu sel teka interna dan teka eksterna. Teka interna adalah lapisan sel sebelah dalam yang kaya dengan pembuluh darah, sedangkan teka eksterna adalah lapisan sebelah luar disertai dengan banyak jaringan ikat. Oosit dikelilingi oleh banyak lapis. Sel granulosa yang langsung berlekatan dengan oosit disebut korona radiata. Sedangkan massa sel yang membungkus oosit dan menonjol ke rongga folikel dikenal dengan nama kumulus ooforus (Nalbandov, 1990 ; Hardjopranto, 1995).

Sebelum terjadinya ovulasi, pembelahan meiosis I dilanjutkan dan menghasilkan oosit sekunder dengan polar bodi I. Jumlah kromosom

berubah dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n). Pada sapi, domba, babi, dan manusia meiosis I akan lengkap sesaat sebelum ovulasi.

Menjelang ovulasi, bila sel-sel kumulus terlepas, mulailah terjadi tingkat akhir pendewasaan ovum. Mula-mula selaput inti menghilang dan kromosom akan berpindah menuju ke permukaan ovum. Sentrosfer akan membelah, kedua sentriol saling menjauh dan terbentuklah spindel di antaranya. Spindel selalu lebih dekat pada salah satu dinding tepi ovum dan permukaan ovum bersama dengan sebagian sitoplasma akan terjulur, dan terbentuklah badan kutub I (Ismudiono, 1996).

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.

2.2. Karakteristik Komponen Oosit

Oosit berbeda dari sel-sel somatik karena oosit mempunyai fungsi khusus. Sedangkan komponen oosit seperti ooplasma, inti, dan organ

intraseluler (kompleks golgi, mitokondria, endoplasmik retikulum, ribosom), pertumbuhannya sama seperti sel somatik pada umumnya (Hozumi, 2001^a).

Diameter oosit sapi keseluruhan termasuk zona pelusida adalah 165 μ dengan ketebalan zona pelusida 12–15 μ . Bentuk oosit sapi memiliki ciri-ciri yang sama dengan kebanyakan oosit mamalia. 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. Zona pelusida ini secara kimiawi terdiri atas protein, glukoprotein, polisakarida, mukopolisakarida. Di antara vitelin dengan zona pelusida terdapat ruangan sempit yang berisi cairan disebut *perivitelin space* atau ruang perivitelin (Ismudiono, 1996).

Sel granulosa yang berada di luar zona pelusida akan mengadakan penjuruan menembus zona pelusida dan mengadakan penetrasi ke dalam oosit. Menurut Hobo *et al.* (1996), penjuruan sel granulosa ini berperan untuk mentransfer nutrisi dari sel folikuler ke dalam oosit.

Pada mikrovili dari sel granulosa yang berada di sekeliling oosit terdapat granula kortikel. Jumlah mikrovili dan penjurumannya akan meningkat sesuai dengan perkembangan dari oosit dan sel granulosa,



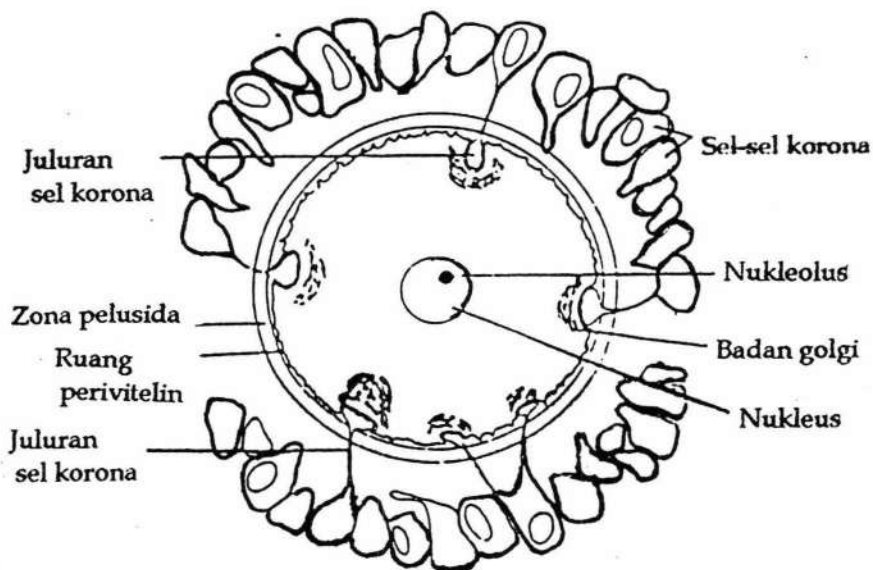
sehingga meningkatkan area permukaan selama pertumbuhan oosit (Hafez, 1993). Melalui pemeriksaan mikroskop elektron, tampak permukaan sel granulosa dari folikel yang berukuran besar (diameter 6 - 12 mm) dipenuhi dengan banyak mikrovili, sedangkan sel granulosa dari folikel berukuran kecil (diameter 3 - 5 mm) terdapat sedikit mikrovili (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Bearden dan Fuquay (1992) mengemukakan bahwa sel granulosa bersama-sama dengan sel teka interna berperan dalam mengadakan biosintesis hormon steroid. Teori yang dikemukakan adalah sel teka interna mampu memproduksi hormon androgen, selanjutnya berdifusi melalui membran dasar untuk diubah menjadi estrogen oleh beberapa enzim yang berasal dari sel granulosa. Sel granulosa juga mengeluarkan komponen lain ke dalam cairan folikel yang diidentifikasi dapat membantu fungsi ovarium. Dikatakan oleh Hozumi (2001^a), bahwa sel granulosa ini berperan pada reaksi akrosom dan kapasitasi sperma pada proses fertilisasi.

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).

Ilustrasi struktur ultra dari komponen-komponen oosit diperlihatkan pada gambar 2.1. berikut ini :



Gambar 2.1. Struktur ultra dari komponen-komponen oosit (Sumber : Gordon, 1994)

2.3. Maturasi Oosit

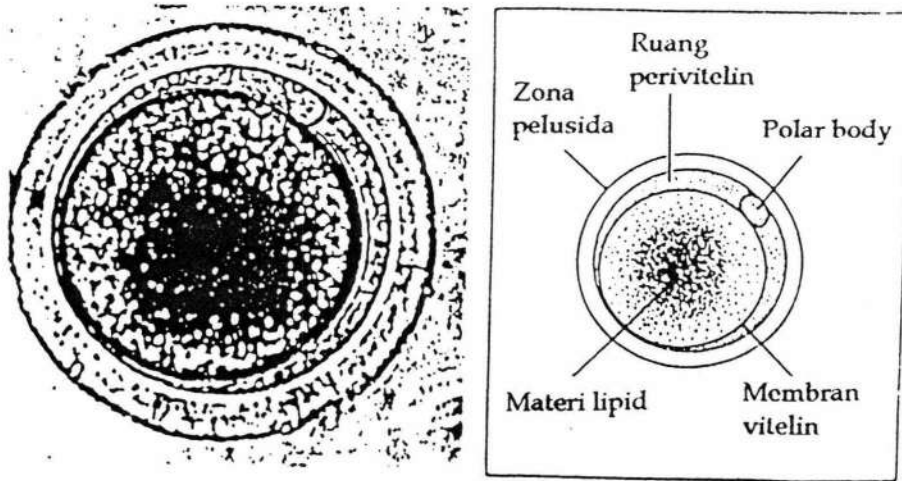
Selama persiapan maturasi, oosit merupakan sel besar dengan inti vesikuler atau vesikula germinalis yang relatif besar pula. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), serta Hafez (1993), oosit praovulasi akan mengalami proses diferensiasi yang ditandai dengan adanya perubahan

inti atau pematangan inti disertai dengan perubahan sitoplasma atau pematangan sitoplasma. Pematangan akhir dari oosit dipacu oleh adanya hormon LH dari kelenjar hipofisa anterior, yang keluar sebelum inti vesikuler dari oosit atau germinal vesikel melebur (*Germinal Vesicle Breakdown - GVBD*). Inti akan melebur dalam beberapa jam setelah kadar LH memuncak dan terjadi pembelahan meiosis dari metafase I ke metafase II secara cepat. 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. Setiap stadium kematangan, oosit mempunyai korelasi dengan tipe sel kumulus ooforus. Diungkapkan oleh Hafez (1993) bahwa tingkat musifikasi dari kumulus dan penyebaran korona berkaitan dengan tahapan maturasi. Maturasi oosit berlangsung dalam media yang secara biokimiawi sama dengan serum darah. Dalam perkembangannya, hubungan antar sel kumulus ooforus akan merenggang waktu mendekati saat ovulasi, disertai dengan keluarnya substansi gelatin antar sel secara serentak sehingga substansi itu tetap memegang sel-sel kumulus yang merenggang. Selain untuk pematangan oosit, sel kumulus juga berfungsi untuk meningkatkan sekresi progesteron, melindungi oosit dari fertilisasi polispermi dengan menjadi barier fisik bagi spermatozoa. Menjelang ovulasi, beberapa sel

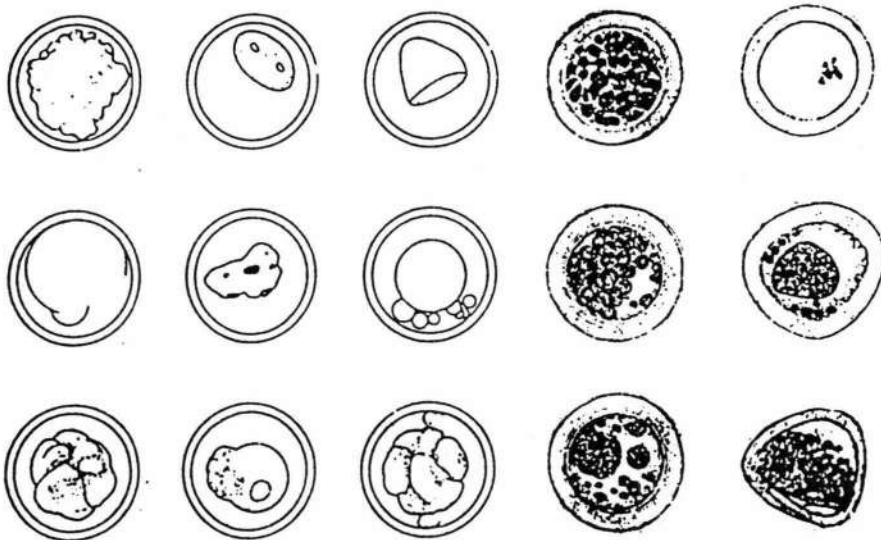
kumulus bersama-sama ovum dan korona radiata akan melepaskan diri dari sel-sel granulosa yang masih tertinggal pada folikel.

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 yang merupakan kelanjutan dari proses pematangan :
 - Fase 4 : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar dan meluas, sedikit berlendir (muskifikasi), 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).



Gambar 2.2. Oosit matang
(Sumber : Gordon, 1994)



Gambar 2.3. Berbagai bentuk oosit yang mengalami degenerasi
(Sumber : Heap dan Flint, 1984 ; Hafez, 1993)

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.

Ilustrasi mengenai oosit matang diperlihatkan pada gambar 2.2., sedangkan gambar 2.3. menunjukkan berbagai bentuk oosit yang mengalami degenerasi.

2.3.1. *Maturasi in vitro*

Oosit yang belum matang sangat bermanfaat bagi fertilisasi *in vitro*, bila dimaturasi di luar tubuh induknya. Saat ini, oosit yang belum matang dapat dengan mudah dimaturasi secara *in vitro* dan angka keberhasilan fertilisasi mencapai 60% - 80%. Selain karena kondisi maturasi nukleus, fertilisasi juga tergantung pada kualitas fisiologis nukleus, sitoplasma, dan zona pelusida yang transparan (Hozumi, 2001^b). Oosit mamalia akan mengalami pematangan inti yang spontan apabila dipupuk dalam media *in vitro*. Dalam media pupukan *in vitro* yang

cocok, meiosis spontan akan berlangsung secara fisiologis sampai mencapai metafase II. Dikatakan oleh Budiono dan Suzuki (1996), seperti yang dikutip oleh Karja *et al.* (1999) bahwa untuk maturasi *in vitro*, medium yang digunakan harus dibuat semirip mungkin dengan kondisi maturasi oosit secara *in vivo* sehingga dapat menjaga *gap junction* antara oosit dan sel-sel kumulus yang mengelilinginya. Komunikasi interseluler melalui *gap junction* penting untuk pertumbuhan oosit secara *in vitro*. *Gap junction* tersebut merupakan jalan lintas nutrisi untuk oosit.

Menurut Hafez (1993), oosit yang dimaturasi secara *in vitro* menunjukkan potensi yang sangat rendah terhadap kemampuan fertilisasi dan perkembangan embrionalnya. Namun, penambahan gonadotropin dan steroid ke dalam medium maturasi akan meningkatkan hasil maturasi *in vitro* serta memperbaiki potensi oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrional. Selain itu, dianjurkan pula oleh Gordon (1994) untuk menambahkan serum sehingga kondisinya hampir sama dengan kondisi maturasi secara *in vivo*.

2.4. 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*. Menurut Mazur (1970) seperti dikutip oleh Juniastrutie (1995), kecepatan pembekuan yang lebih lambat mengakibatkan sel lebih lama berada dalam situasi *solution effect*. Dikatakan pula bahwa *solution effect* merupakan perubahan drastis larutan dalam sel sewaktu pembekuan akibat terbentuknya kristal es di luar dan di dalam sel. 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). Jadi dalam proses pembekuan harus diperhatikan prinsip-prinsip perpindahan air keluar masuk melalui membran sel, baik dehidrasi sel sebelum *deepfreezing* dan rehidrasi pada saat pencairan kembali (*thawing*). Untuk mencapai tujuan proses kriopreservasi perlu dipertahankan sesempurna mungkin sifat-sifat material biologis, terutama viabilitasnya.

Secara garis besar, Supriatna dan Pasaribu (1992) mengemukakan 3 faktor yang dapat menyebabkan sel mengalami degenerasi atau mati karena proses pembekuan, yaitu :

- a. Kerusakan mekanis dengan timbulnya pembentukan kristal es intraseluler yang dapat mempengaruhi struktur sel. Kerusakan sel dapat terjadi pada organel dalam sitoplasma atau pecah karena ekspansi es.
- b. Adanya dehidrasi dari suspensi media intra dan ekstraseluler sehingga konsentrasi media pembekuan menjadi toksik dan bersifat letal. Dehidrasi juga dapat menimbulkan presipitasi,

koagulasi, hancurnya struktur molekul, kenaikan permeabilitas dan viskositas, serta gangguan keseimbangan ion.

- c. Perubahan-perubahan fisika kimiawi diantaranya denaturasi, presipitasi, koagulasi protein, disosiasi ion, dan sifat-sifat adsorbtif atau pengikatan air akan hilang.

Interaksi dari ketiga faktor di atas dapat mempercepat sel mengalami kematian. Penyebab kerusakan seluler dan kematian sistem biologis akibat proses pembekuan, juga digambarkan pada tabel 2.1.

Untuk mereduksi pengaruh letal dari proses kriopreservasi sel berupa efek larutan maupun pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler, maka 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. Diyakini oleh Gordon (1994), bahwa efek protektif dari krioprotektan ini merupakan hasil dari berbagai faktor, seperti mengurangi perusakan akibat *solution effect* dan pembekuan intraseluler, mempercepat penurunan temperatur saat terjadinya pembekuan intraseluler, dan efek stabilisasi pada sel membran.

Tabel 2.1. Faktor-faktor penyebab kerusakan seluler dan kematian pada sistem biologis akibat proses pembekuan

SISTEM	TIPE/ PENYEBAB KERUSAKAN
Semua sistem	Pembentukan kristal es intra & ekstraseluler, apoptosis, toksisitas, ketidakseimbangan kalsium, radikal bebas, level ATP, metabolisme umum, kegagalan fertilisasi, kegagalan pembelahan, aktivasi partenogenesis.
Membran	Robek, berlubang, perlekatan, mikrovili, fase transisi.
Kromosom	Hilang, bertambah, polispermia, poligini (gagal mengeluarkan benda kutub), tetraploidi
DNA	Apoptosis, menyatu, tersusun kembali
Sitoskeleton	Mikrotubulus menyebar, aktin
Protein/ enzim	Dehidrasi, tidak berfungsi
Ultrastruktur	Mikrovili, mitokondria, vesikel, granula kortikel, zona pelusida
Zona pelusida	Mengeras, patah
Lipid	Radikal bebas

Sumber : Shaw *et al.* (2000)



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^b). Yang biasa dipakai sebagai krioprotektan intraseluler adalah gliserol (gliserin), dimetilsulfoksid (DMSO), etilen glikol, 1,2 propanediol. Gliserol dan DMSO paling banyak digunakan dalam pembekuan embrio sapi. Sedangkan krioprotektan ekstraseluler yang dapat digunakan adalah polivinil pirolidon (PVP), gula (sukrosa, glukosa, rafinosa), protein dan lipoprotein, kuning telur, serum darah, susu.

Dikatakan oleh Niemann (1991) bahwa tingkat perembesan krioprotektan intraseluler tergantung dari koefisien permeabilitas sel terhadap masing-masing agen, gradien konsentrasi antara krioprotektan intra dan ekstraseluler, suhu, dan area permukaan sel.

2.4.1. Metode Kriopreservasi

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), pada umumnya prosedur pelaksanaan metode 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 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).

Tahap pemaparan krioprotektan, baik pada waktu penambahan krioprotektan pra pembekuan maupun pada saat pembilasan pasca pencairan dilakukan secara bertahap. *Straw* dibekukan secara tiba-

tiba dari temperatur dengan ke temperatur 0°C , kemudian -4°C sampai -7°C sebagai temperatur *seeding*. *Seeding* adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan permulaan terbentuknya kristal es pada temperatur yang sangat dingin, biasanya dilakukan dengan menyentuhkan permukaan *straw* pada pinset yang sangat dingin. Setelah *seeding*, kristal es terbentuk sangat cepat dan pembekuan dilanjutkan ke suhu -35°C , sebelum akhirnya dicelupkan ke dalam nitrogen cair.

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

Tahap pemaparan dilakukan seperti pada metode pembekuan bertahap, tetapi 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.

Di samping beberapa metode yang sudah disebutkan, masih banyak dilakukan berbagai percobaan yang bertujuan untuk menyederhanakan langkah atau prosedur *freezing* dan *thawing*. Namun, bagaimanapun juga tetap belum dapat diperoleh hasil yang stabil. Beberapa di antaranya menunjukkan tingkat konsepsi yang rendah. Menurut Hozumi (2001^b), di masa yang akan datang metode *freezing* dan/atau *thawing* ini dapat lebih dikembangkan dengan penggunaan yang praktis.

Prosedur *thawing* yang dilakukan oleh banyak peneliti pun bervariasi. Ada yang melakukan pencairan dan pembilasan krioprotektan secara bertahap, ada pula yang langsung dibilas dengan sukrosa. Lim *et al.* (1992), Otoi *et al.* (1993), Schellander *et al.* (1994) melakukan pencairan dengan membiarkan *straw* 5 detik di udara, kemudian dicelupkan ke dalam waterbath 37°C selama 30 detik. Setelah itu dilakukan pembilasan krioprotektan secara bertahap dengan menurunkan konsentrasi krioprotektan dan diakhiri dengan pembilasan dalam sukrosa. Sedangkan Sun *et al.* (1995) melakukan vitrifikasi pada oosit sapi dengan prosedur pencairan dan pembilasan krioprotektan yang lebih sederhana, yaitu oosit

dicairkan dengan mencelupkan *straw* ke dalam air bersuhu 30°C, kemudian oosit dibilas 2 kali dengan 0,5 M sukrosa.

2.5. Vitrifikasi

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 ; Tada, *et al.*, 1993). 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.

Dikatakan oleh Kobayashi *et al.* (1990) dan Niemann (1991) bahwa mekanisme yang terjadi pada metode vitrifikasi ini adalah berlangsungnya pepadatan larutan karena meningkatnya viskositas selama pembekuan, sehingga larutan tersebut seolah-olah menjadi seperti kaca. Jadi, 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 nitrogen cair terjadi dehidrasi yang sangat cepat, tidak terbentuk kristal-kristal es intra-ekstraseluler, dan larutan seolah-olah menjadi seperti kaca. Meskipun menurut Arav *et al.* (2000), peningkatan kecepatan pendinginan pada temperatur kritis (20°C - 12°C) merupakan faktor penentu keberhasilan kriopreservasi oosit sapi, dan bukan karena pengurangan pembentukan kristal-kristal es selama vitrifikasi.

Efek yang merugikan dari vitrifikasi ini, justru diakibatkan oleh toksisitas dan *osmotic injury* selama sel dipaparkan di dalam krioprotektan yang berkonsentrasi tinggi, sehingga mempengaruhi kemampuan hidup dari sel tersebut (Naitana *et al.*, 1996).

Menurut Rall (1987) yang dikutip oleh Niemann (1991), larutan vitrifikasi mempunyai 3 karakteristik, yaitu larutan harus mengandung satu atau lebih krioprotektan intraseluler yang berkonsentrasi tinggi, setiap larutan memerlukan komponen garam fisiologis, dan pada larutan tersebut harus ditambahkan makromolekul untuk meningkatkan kemampuan jaringan terhadap kondisi yang sangat beku dan seperti kaca.

2.6. Kriopreservasi Oosit dengan Teknik Vitrifikasi

Teknik kriopreservasi pada berbagai tipe sel, jaringan, dan organ telah banyak dilakukan, dan perkembangan yang pesat juga terjadi pada kriopreservasi gamet. Penggunaan semen beku dipakai secara meluas dalam beberapa dekade ini, demikian juga dengan kriopreservasi embrio yang tingkat keberhasilannya sangat memuaskan. Menurut Shaw *et al.* (2000), kriopreservasi embrio telah digunakan secara luas sebagai teknologi bantu reproduksi pada program IVF hewan ternak dan manusia. Keyakinan terhadap teknik kriopreservasi embrio terus meningkat karena viabilitas embrio relatif konsisten dan penerapan pada hewan ternak dapat diterima secara komersial.

Penyediaan embrio dengan teknik kriopreservasi yang telah banyak dilakukan dalam program bayi tabung pada manusia ini ternyata menimbulkan problem di luar hal yang teknis, karena dianggap tidak etis dan dilarang di beberapa negara (Gordon, 1994 ; Wetzels, 1996 ; Shaw *et al.*, 2000). Sehingga, kemudian penelitian diarahkan pada kriopreservasi oosit sebagai alternatif pengganti pengawetan embrio. Penyediaan dan penyimpanan oosit bagi program IVF pada manusia berkaitan dengan penghematan biaya IVF dan tersedianya sel oosit bila sewaktu-waktu terjadi kegagalan pada program IVF, serta penyimpanan oosit sebelum

seorang wanita menjalani terapi atau kemoterapi yang bisa berakibat kerusakan pada sel oositnya (Naaktgeboren, 1996). Dikatakan pula oleh Aubard *et al.* (1994) bahwa kriopreservasi oosit dapat meningkatkan bantuan secara medis bagi pasangan suami istri yang sulit memperoleh keturunan dengan membentuk bank oosit. Sedangkan pada bidang peternakan, kriopreservasi oosit dapat digunakan sebagai alternatif penyediaan gamet dan pengembangan bidang bioteknologi reproduksi.

Tidak seperti pada kriopreservasi embrio, studi mengenai kriopreservasi oosit sering tidak terduga hasilnya dan penggunaan prosedur kriopreservasi ini secara komersial masih sangat terbatas (Shaw *et al.*, 2000). Selain itu, permasalahan yang berkaitan dengan kriopreservasi oosit ini sampai sedemikian jauh belum juga terpecahkan (Sun *et al.*, 1995). Sifat oosit dan embrio seperti ukuran, bentuk, permeabilitas, kualitas, dan sensitivitas yang tergantung pada spesies, tahap perkembangan, dan asal-usul (*origin*), menentukan kondisi yang paling tepat untuk keberhasilan kriopreservasi. Kondisi kriopreservasi agar mencapai hasil yang optimal, masing-masing berbeda pada oosit dan embrio (Vajta, 2000).

Pada awal studi banyak dilakukan kriopreservasi oosit menggunakan prosedur pembekuan yang lambat dan konvensional. Berbagai penelitian dilakukan dan Otoi *et al.* (1993) mengamati kapasitas

perkembangan oosit sapi yang matang secara *in vitro* dibekukan dengan metode pembekuan bertahap hingga mencapai suhu -196°C dalam beberapa krioprotektan yang berbeda. Dari penelitian tersebut diperoleh kesimpulan bahwa penggunaan krioprotektan 1,2 propanediol lebih baik dari pada gliserol maupun DMSO, baik itu dalam hal kemampuan fertilisasi secara *in vitro*, kemampuan hidup dan berkembang setelah fertilisasi, maupun dalam menghasilkan oosit dengan morfologi normal setelah proses pencairan kembali atau *thawing*. Kemampuan fertilisasi dari oosit sapi yang dibekukan dan dicairkan kembali, kemudian ditransferkan ternyata lebih rendah dibandingkan dengan kelompok oosit segar atau yang tidak dibekukan. Dikatakan oleh Otoi *et al.* (1992, 1993) bahwa hal ini kemungkinan disebabkan oleh gangguan pada plasma membran, terjadi disorganisasi yang ekstensif pada ooplasma, spindle mengalami kerusakan, dan adanya perubahan struktural di zona pelusida saat proses pembekuan. Sedangkan menurut Glass dan Voelkel (1990) seperti yang dikutip oleh Gordon (1994), ditengarai bahwa faktor yang menyebabkan oosit kehilangan viabilitasnya adalah berhubungan dengan proses pembekuan bertahap sampai -7°C , kemudian berlanjut sampai -35°C . Peneliti ini mengambil kesimpulan bahwa viabilitas oosit yang hilang secara signifikan selama proses kriopreservasi disebabkan oleh pembekuan dan terbentuknya kristal-kristal es.

Usaha-usaha untuk mengembangkan teknik pembekuan oosit terus dilakukan dengan penyederhanaan prosedurnya. Banyak peneliti seperti yang dilaporkan oleh Rayos *et al.* (1994) melakukan studi pada pembekuan oosit tikus dengan teknik vitrifikasi dan hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perkembangan yang baik pada oosit tikus yang difertilisasi *in vitro* setelah proses vitrifikasi. Sedangkan Hochi *et al.* (1995) meneliti viabilitas dari oosit kuda yang belum matang setelah dilakukan kriopreservasi dengan metode vitrifikasi. Krioprotektan yang digunakan oleh Hochi *et al.* adalah etilen glikol 40%, ficoll 70 18%, dan sukrosa 0,3 M. Oosit yang belum matang ini dibekukan dengan proses vitrifikasi setelah dipaparkan selama 10 sampai 20 menit dalam etilen glikol pada suhu 20°C sampai 30°C. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya oosit yang hidup dan berkembang sampai mencapai tahap metafase II setelah 32 jam mengalami proses maturasi *in vitro*.

Penggunaan krioprotektan 1,2 propanediol menunjukkan hasil yang baik pada laporan yang diberikan oleh Niemann (1991) dan Otoi *et al.* (1992, 1993). Tetapi pada penelitian berikutnya, Otoi *et al.* (1998) menunjukkan bahwa penggunaan krioprotektan etilen glikol 40% dan 50% lebih baik pengaruhnya terhadap daya hidup oosit sapi yang matang setelah proses vitrifikasi, dibandingkan dengan etilen glikol 20% dan 30%. Penggunaan etilen glikol sebagai krioprotektan intraseluler pada media

vitrifikasi diyakini dapat menjadi faktor utama untuk meningkatkan keberhasilan fertilisasi juga diungkapkan oleh Rayos *et al.* (1993); Gordon (1994); Dhali *et al.* (2000).

Dilaporkan pula bahwa penambahan gula ke dalam media vitrifikasi akan meningkatkan kemampuan hidup pasca pencairan kembali (Kashiwazaki *et al.*, 1994 ; Nagashima *et al.*, 1994) dan pada tahap perkembangan embrio (Saito *et al.*, 1994). Mc.Williams *et al.* (1995) juga membuktikan bahwa beragam sakarida yang ditambahkan sebagai krioprotektan ekstraseluler (*non permeating saccharides*) dapat menjadi bufer osmotik bagi pemulihan kondisi oosit, zigot, dan embrio setelah proses vitrifikasi. Sedangkan penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro, secara keseluruhan tidak memberikan pengaruh yang berarti, namun Pugh *et al.* (1994) dalam laporannya menganjurkan agar dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penambahan BSA ini. Demikian juga dengan waktu pemaparan krioprotektan sebelum dilakukan proses vitrifikasi, ternyata berpengaruh terhadap kemampuan hidup oosit. Dhali *et al.* (2000) menunjukkan bahwa waktu pemaparan 3 menit dapat digunakan untuk vitrifikasi oosit kerbau, sedangkan Rayos *et al.* (1993), melaporkan bahwa waktu pemaparan 10', 20', 40' menunjukkan hasil yang baik terhadap morfologi oosit tikus dibandingkan dengan waktu pemaparan 5' sebelum dilakukan *quick freezing*. Sementara itu,

Otoi *et al.* (1998) menunjukkan hasil yang berbeda. Pada kriopreservasi oosit sapi yang matang dengan metode vitrifikasi, waktu pemaparan 1 menit, 5 menit, dan 10 menit tidak menampakkan perbedaan yang signifikan.

Tingkat kematangan oosit yang mengalami proses pembekuan juga menimbulkan akibat yang berbeda. Dari penelitian Lim *et al.* (1992) mengenai kemampuan hidup oosit sapi pada beberapa tingkat kematangan, setelah proses pembekuan dan pencairan kembali ditarik suatu kesimpulan bahwa kemampuan hidup oosit sapi yang belum matang lebih rendah dari pada oosit sapi yang matang. Seperti dikatakan oleh Gordon (1994), bahwa di Jepang, beberapa peneliti mendemonstrasikan bahwa oosit sekunder sapi dapat hidup setelah mengalami pembekuan dengan metoda vitrifikasi dengan morfologi yang normal dan setelah fertilisasi beberapa oosit berkembang sampai tahap blastosis. Dua kebuntingan juga terjadi setelah dilakukan transfer embrio.

Semua oosit matang yang berada pada tahap metafase II peka terhadap kerusakan akibat proses pembekuan, karena spindel yang memegang kromosom mengalami depolimerisasi ketika mencapai suhu lebih rendah. Meskipun spindel kembali pada kondisi semula saat temperatur menjadi normal, pendinginan dapat meningkatkan insiden aneuploidi karena penyatuan kembali kromosom mungkin tidak tepat

pada spindel yang baru terbentuk ulang. Meskipun terjadi kerusakan pada spindel oosit matang karena proses pembekuan, kemampuan hidup oosit matang masih lebih baik dibandingkan dengan penggunaan oosit yang belum matang (Lim *et al.*, 1992 ; Le Gal, 1996). Juga dibuktikan oleh Fuku *et al.* (1995^a), bahwa oosit pada fase germinal vesikel (*GV stage*) lebih sensitif terhadap krioprotektan dibandingkan dengan oosit yang telah dimatangkan secara *in vitro*.

Sun *et al.* (1995) juga melakukan kriopreservasi pada oosit sapi yang matang dengan teknik pembekuan bertahap dan vitrifikasi. Krioprotektan yang digunakan adalah 1,6 M Propanediol dan 0,5 M Sukrosa dengan waktu pemaparan 10 menit dan 20 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa meskipun sebagian besar oosit (86,1%) viabel yang ditentukan berdasarkan morfologi normalnya, namun ternyata kompetensi perkembangannya sangat terganggu. Rata-rata angka fertilisasi dan pembelahannya hanya 30% dan 7,4%. Observasi secara ultrasruktural dengan mikroskop elektron menunjukkan adanya kerusakan subseluler yang lebih parah pada pembekuan bertahap dibandingkan dengan oosit yang divitrifikasi. Terlihat kerusakan hebat pada mitokondria dan vesikel. Sementara itu, granula vesikel mengalami eksositosis pada 2 metode pembekuan. Sehingga disimpulkan bahwa penurunan kemampuan berkembang setelah kriopreservasi, utamanya

disebabkan pengerasan zona pelusida akibat adanya eksositosis granula kortikel dan kerusakan struktur subseluler. Fuku *et al.* (1995^a ; 1995^b) juga melihat adanya eksositosis granula kortikel, selain perubahan zona pelusida akibat sedikitnya jumlah granula kortikel di ooplasma. Dikatakan bahwa granula kortikel merupakan salah satu elemen penentu kemampuan fertilisasi oosit sapi yang dibekukan. Vitrifikasi juga menginduksi modifikasi mikrovili, mitokondria, ooplasma, dan pembentukan vesikel.

Mencermati kondisi yang demikian, berbagai teknik dan metode terus dikembangkan untuk memperkecil pengaruh negatif proses pembekuan terhadap viabilitas dan kemampuan berkembang sel. Belakangan ini ditemukan teknik baru untuk mengurangi terjadinya kerusakan akibat pembekuan pada embrio dan oosit, yaitu dengan menarik *straw* sehingga mengecil, memanjang, dan dindingnya menipis. Teknik ini dikenal dengan istilah *Open Pulled Straw (OPS)* yang dilakukan dan dipatenkan oleh Vajta *et al.* (1998 ; 2000), juga dicoba oleh Hochi *et al.* (2000) dengan keberhasilan yang memuaskan. Teknik *OPS* ini dapat menyebabkan kecepatan pembekuan berlangsung sangat singkat, sehingga memungkinkan untuk menghindari kerusakan akibat pembekuan serta mengurangi toksisitas dan dampak osmotik. Dalam penelitiannya, Vajta *et al.* (1998) melaporkan bahwa dari 184 oosit yang

divitrifikasi, 25 % berkembang menjadi blastosis setelah fertilisasi *in vitro* dan diikuti dengan kebuntingan. Meskipun demikian, Yang *et al.* (2000), masih meragukan efek yang menguntungkan dari teknik ini.

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN
HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

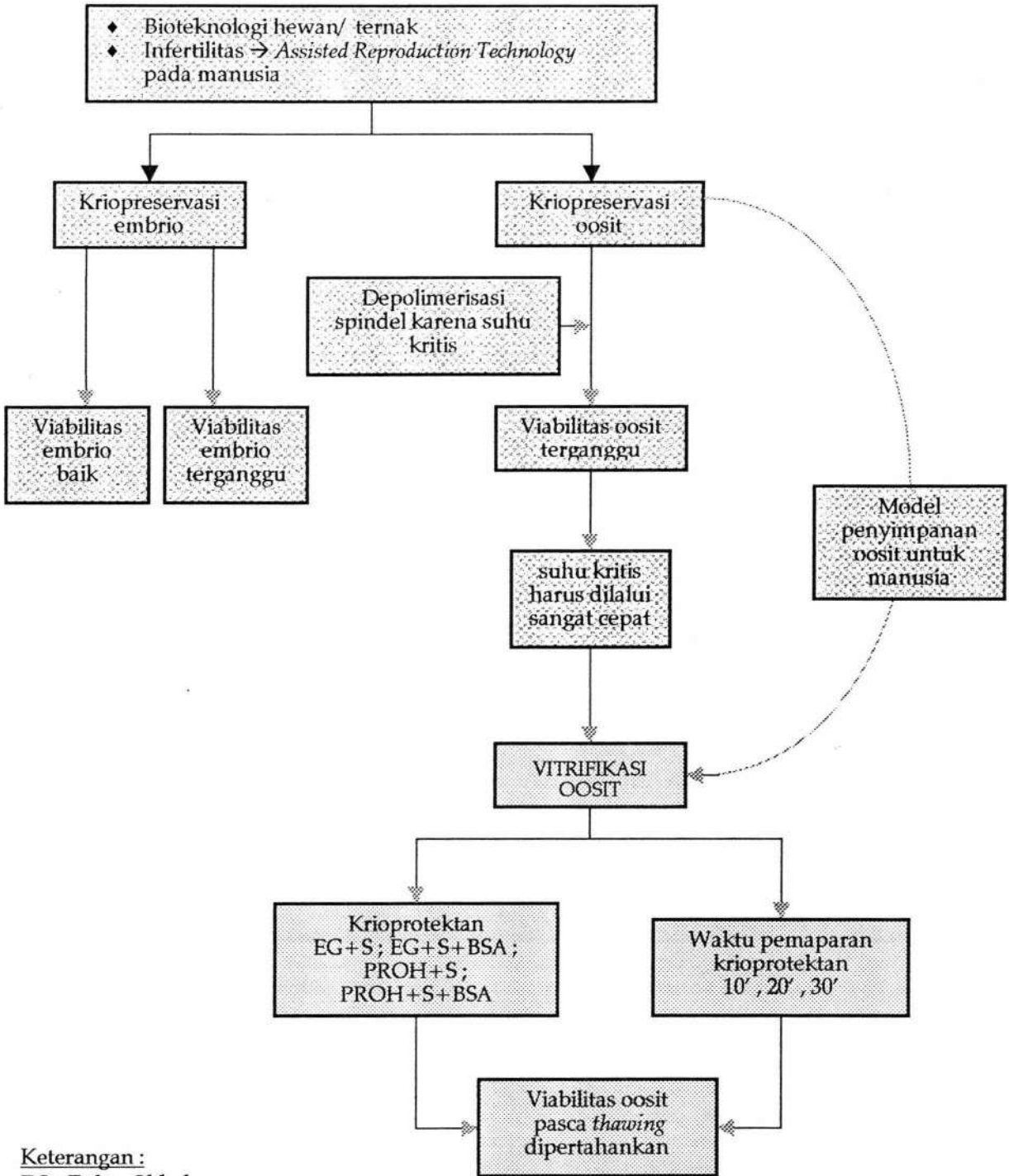
Bagi bidang peternakan, kriopreservasi embrio dilakukan sebagai alternatif pengembangan bioteknologi reproduksi. Sedangkan bagi manusia, kriopreservasi embrio diperlukan dalam rangkaian proses teknologi bantu reproduksi (*Assisted Reproduction Technology* = ART) sebagai jalan keluar bagi pasangan suami istri yang mengalami infertilitas atau sulit memperoleh keturunan. Selain kriopreservasi embrio, dilakukan aplikasi lain berupa kriopreservasi oosit.

Penurunan suhu sampai di bawah 0°C merupakan problem utama. Penggunaan prosedur pembekuan lambat sangat merugikan bagi oosit dari spesies yang sensitif terhadap penurunan suhu tersebut, karena harus melalui suhu kritis yang paling banyak menyebabkan terjadinya kerusakan pada oosit (Kasai, 1996 ; Shaw *et al*, 2000). Oleh karena itu perlu dikembangkan penggunaan prosedur pembekuan cepat atau sangat cepat untuk menghindari suhu kritis.

Secara teknis, metode vitrifikasi atau pembekuan cepat pada kriopreservasi oosit mamalia dapat mengurangi kerusakan sel akibat

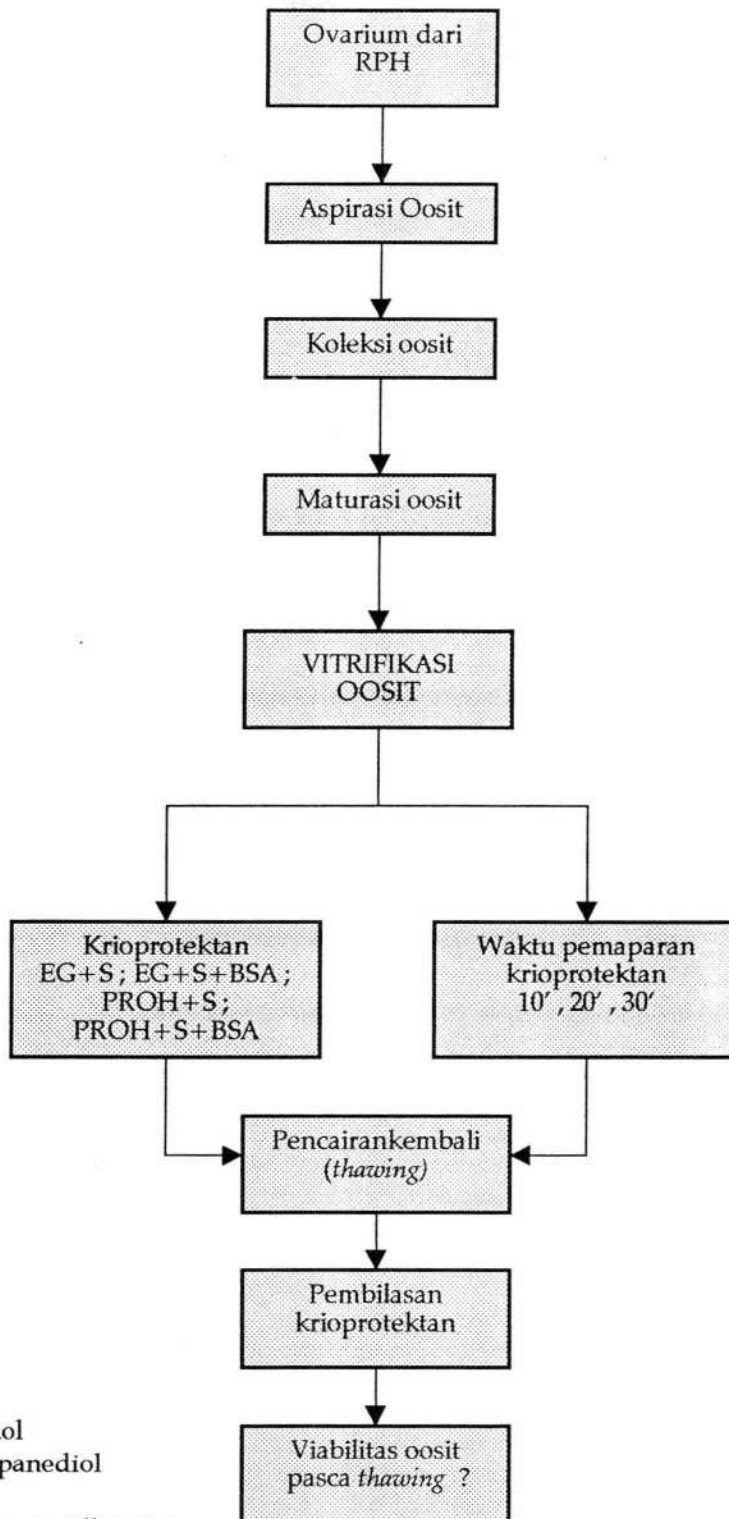
terbentuknya kristal es, karena suhu kritis dapat dilalui dengan sangat cepat.

Pemakaian krioprotektan etilen glikol atau 1,2 propanediol dengan menambahkan sukrosa diduga lebih baik dibandingkan dengan krioprotektan lain. Sedangkan penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro, secara keseluruhan mungkin memberikan efek yang signifikan. BSA yang ditambahkan ke dalam krioprotektan diduga akan melindungi membran sel di fase *post thawing*, sehingga membran sel tetap stabil. Lama waktu pemaparan krioprotektan sebelum dilakukan proses vitrifikasi, diduga berpengaruh terhadap kemampuan hidup oosit.



Keterangan :
 EG : Etilen Glikol
 PROH : 1,2 Propanediol
 S : Sukrosa
 BSA : Bovine Serum Albumin

Gambar 3.1 : Skema Kerangka Konseptual



Gambar 3.2. Skema Kerangka Operasional Penelitian

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan berbagai gambaran yang telah dikemukakan, dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Metode vitrifikasi dengan krioprotektan Etilen Glikol atau 1,2 Propanediol yang masing-masing ditambah Sukrosa dan kombinasi Sukrosa + Bovine Serum Albumin (BSA) dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.
2. Lama waktu pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.
3. Kombinasi macam krioprotektan dan lama waktu pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi berinteraksi mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial 4×3 . Faktor pertama adalah macam krioprotektan etilen glikol dan 1,2 propanediol, masing-masing ditambah sukrosa dan kombinasi sukrosa + BSA. Faktor ke dua adalah lama waktu pemaparan krioprotektan sebelum proses vitrifikasi yaitu 10 menit, 20 menit, 30 menit, dengan 4 replikasi.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit sapi hasil aspirasi ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya, kemudian dimaturasi secara *in vitro* sampai menjadi oosit yang matang.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi Variabel

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah 4 macam media vitrifikasi atau krioprotektan, yaitu (1) Etilen Glikol + Sukrosa (EG+S), (2) Etilen Glikol + Sukrosa + Bovine Serum Albumin (EG+S+BSA), kemudian (3) 1,2 Propanediol + Sukrosa (PROH+S), (4) 1,2 Propanediol + Sukrosa + Bovine Serum Albumin (PROH+S+BSA), dan 3 macam waktu pemaparan krioprotektan, yaitu (1) 10 menit, (2) 20 menit, dan (3) 30 menit, serta kombinasi antara macam krioprotektan dengan lama waktu pemaparan krioprotektan.

Variabel tergantung adalah persentase morfologi oosit dan persentase oosit yang hidup.

Variabel kontrol adalah ruangan penelitian, inkubator anaerob, peralatan dan bahan vitrifikasi, dan alat ukur/hitung data dari hasil penelitian.

4.3.2. Definisi Operasional Variabel

Vitrifikasi oosit adalah metode pembekuan dengan cara membenamkan langsung *ministraw* yang berisi oosit dalam krioprotektan ke dalam nitrogen cair dengan suhu - 196°C.

Etilen glikol dan 1,2 propanediol adalah krioprotektan intraseluler yang akan digunakan pada proses vitrifikasi oosit. Sukrosa dan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai krioprotektan ekstraseluler.

Pengamatan dan penilaian terhadap viabilitas oosit berdasarkan pada persentase morfologi oosit dan persentase oosit yang hidup.

Kualitas oosit setelah pencairan kembali dan pembilasan krioprotektan ditentukan berdasarkan penilaian morfologis menurut Lim *et al.* (1992); Otoi, *et al.* (1993); Schellander, *et al.* (1994), dan Hochi, *et al.* (1995) yang melukiskan kondisi oosit morfologi normal sebagai berikut : plasma membran intak, ooplasma bergranulasi homogen, zona pelusida dan ooplasma berbatas jelas. Sedangkan morfologi oosit yang tidak normal menunjukkan bentuk yang tidak teratur dengan ooplasma gelap dan berfragmentasi atau piknosis.

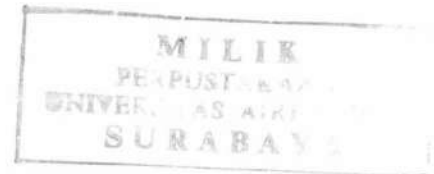
Sedangkan untuk menentukan persentase hidup-mati oosit, digunakan mikroskop fluoresen dengan pewarnaan propidium iodide (PI). Oosit yang hidup, ooplasmanya tidak akan menyerap warna (putih) dan pada oosit yang mati, ooplasma berwarna merah.

4.4. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Ovarium sapi dalam keadaan segar sebanyak 150 buah ovarium yang didapatkan dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya. Oosit diperoleh dari aspirasi folikel berukuran 3-6 mm.
- b. Bahan-bahan untuk koleksi ovarium, aspirasi, pencucian, dan maturasi oosit, terdiri atas NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, aquades, gentamisin sulfat, *mineral oil* (*Sigma Co. USA*), PBS, TCM 199 (*Sigma Co. USA*) , BSA *fraction V* (*Sigma Co. USA*), dan glukosa, natrium piruvat, NaHCO_3 , hormon FSH dan LH.

- c. Bahan-bahan untuk mengamati tahap pematangan oosit, yaitu larutan fiksasi asam asetat dan etanol, pewarna aceto orcein 1%, larutan penghilang warna aceto gliserol.
- d. Media untuk krioprotektan, terdiri atas etilen glikol (*p.a. Merck*), 1,2 propanediol (*p.a. Merck*), sukrosa, BSA.
- e. Nitrogen cair
- f. Zat pewarna propidium iodide (*Sigma Co. USA*).
- g. Parafin padat.
- h. Kapas, kertas tisu, alumunium foil.



4.5. Alat Penelitian

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah termos kecil, *refrigerator*, bilik steril, alat suntik (*syringe disposable*) dengan jarum ukuran 18 Gauge dan dengan volume 1 ml, 10 ml, 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.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya dan Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga. Waktu pelaksanaan penelitian berlangsung selama 7 bulan, mulai bulan Juli 2000 s/d Februari 2001.

4.7. Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Pelaksanaan kriopreservasi oosit dengan teknik vitrifikasi ini dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu :

4.7.1. Koleksi Ovarium dari Rumah Potong Hewan

Sampel ovarium segar diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya, dengan jumlah sebanyak 35 – 40 ovarium setiap kali pengambilan. Ovarium yang diperoleh dicuci dengan larutan NaCL 0,9% atau garam fisiologik yang sudah ditambahkan antibiotika Gentamycin Sulfat 50 µg per ml (Lampiran 9). Selanjutnya ovarium dibawa ke laboratorium dalam termos berisi

larutan garam fisiologik dengan suhu 36 - 37°C, maksimal 5 jam setelah pengambilan.

4.7.2. Aspirasi dan Pengamatan Oosit

Prosedur Aspirasi Oosit

Sebelum melakukan aspirasi oosit, lantai dan meja tempat bekerja dihapus hama terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% atau larutan antiseptik organik. Ovarium dicuci sebanyak 2-3 kali dengan larutan garam fisiologik bersuhu 38°C, kemudian ovarium ditempatkan dalam gelas baker dan disimpan dalam *waterbath* atau penangas air bersuhu 38°C. Diambil 1 ovarium dengan pinset steril dan permukaannya dikeringkan dengan tisu steril. Selanjutnya semprit (alat suntik) diisi dengan 1-1,5 ml media PBS+ (Lampiran 10) dengan memakai jarum suntik ukuran 18 Gauge ditusukkan ke bagian parenkim ovarium dekat folikel. Dilakukan aspirasi folikel berdiameter 3-6 mm yang berada di dekat titik tusuk jarum (tanpa mencabut jarum terlebih dahulu). Setelah cairan folikel terhisap semua atau apabila isi alat suntik telah mencapai 3-4

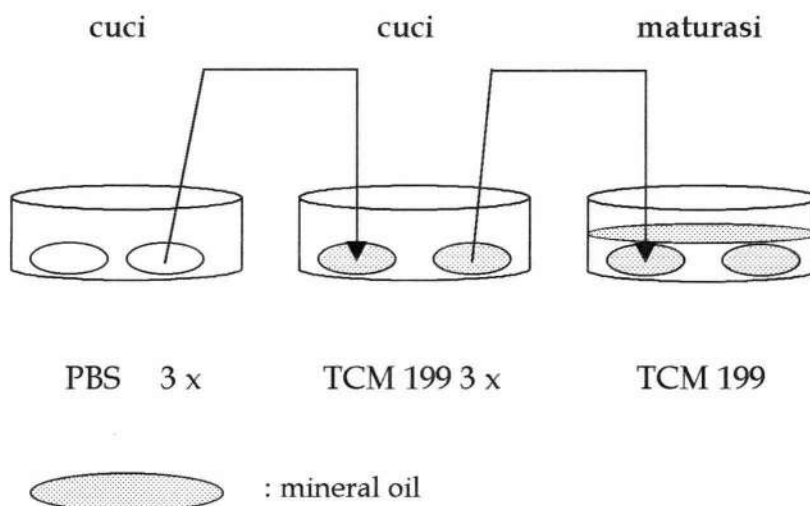
ml, cairan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang steril dan disimpan di dalam penangas air. Saat menghisap cairan atau memindahkan dalam cawan harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak terjadi kerusakan kumulus.

Pengamatan dan Klasifikasi Oosit

Cairan aspirasi dituang dari tabung reaksi ke dalam cawan petri diameter 90 mm, kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Apabila oosit dapat ditemukan, kemudian diambil dengan pipet pasteur yang diameter ujungnya sama dengan diameter oosit. 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*.

4.7.3. Maturasi Oosit *In Vitro*

Setelah dicuci dalam medium TCM 199 3 kali berturut-turut, kemudian oosit dipindahkan ke dalam medium maturasi TCM 199 (Lampiran 11) yang diberi BSA 3%, FSH 0,01 mg/ml, LH 5 µg/ml, dan gentamisin sulfat 50 µg/ml. Ke dalam medium tetes 50 µl diisi masing-masing sebanyak 30-35 oosit (gambar 4.1.), lalu dimaturasi selama 22 jam dalam inkubator mengandung 5% CO₂ dengan suhu 38,5°C.



Gambar 4.1. Diagram proses pencucian dan pematangan oosit

Setelah mengalami proses maturasi, oosit diperiksa di bawah mikroskop untuk dilihat tahap pematangannya.

Pengamatan Tahap Pematangan Oosit

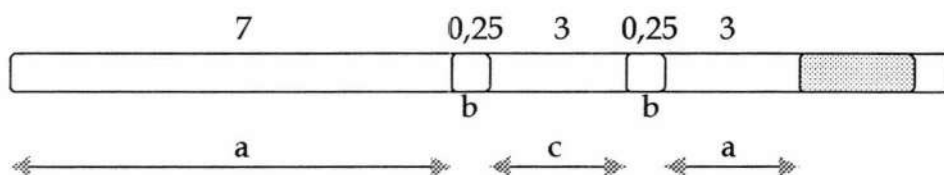
Oosit yang telah mengalami maturasi ini diamati tahap pematangannya dengan pewarnaan aceto orcein. Oosit yang akan diwarnai diletakkan pada gelas obyek dan ditutup dengan gelas penutup yang sebelumnya sudah diberi parafin pada ke empat sudutnya. Gelas penutup ditekan pelan-pelan hingga oosit merata. Kemudian preparat/ gelas obyek dicelupkan ke dalam larutan fiksasi (asam asetat 90% : etanol 70% = 3 : 1) selama 3-4 hari. Setelah itu, preparat diambil perlahan-lahan dan diteteskan pewarna aceto orcein 1% pada salah satu sisi gelas penutup, didiamkan selama 1-2 menit. Setelah oosit terwarnai, media pewarna digantikan dengan larutan penghilang warna aseto gliserol dengan cara meneteskan larutan penghilang warna pada salah satu sisi gelas penutup sambil larutan dari sisi lain gelas penutup dihisap dengan kertas tisu hingga semua pewarna terserap. Agar terhindar dari kekeringan, sisi gelas penutup difiksasi dengan cat kuku. Kemudian preparat diamati di bawah mikroskop.

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.

4.7.4. 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 ; 40% EG + 0,3M S + 6% BSA ; 40% PROH + 0,3M S ; 40% PROH + 0,3M S + 6% BSA (Lampiran 12), masing-masing mengandung sebanyak 30-40 oosit. Selanjutnya oosit di dalam krioprotektan ini dipaparkan pada suhu ruangan, masing-masing dengan waktu pemaparan yang berbeda yaitu 10 menit, 20 menit, dan 30 menit. Selesai pemaparan, oosit siap dikemas dalam *ministraw* transparan 0,25 cc (*French straw*) yang sudah mengalami *Open Pulled Straw* (OPS) atau teknik penarikan *straw* sehingga memanjang dan mengecil, serta dindingnya menjadi lebih tipis, untuk proses vitrifikasi (Vajta *et al.*, 1998). Cara pengemasan

dilakukan sebagai berikut : pertama-tama aspirasi diluen 1M Sukrosa ke dalam *straw* sepanjang 3 cm, kemudian dibuat rongga udara 0,25 cm. Sebanyak 6-16 oosit dalam krioprotektan diambil dari cawan petri, lalu diaspirasi sepanjang 3 cm, setelah itu dipisahkan kembali dengan rongga udara 0,25 cm. Rongga sisanya diisi dengan diluen 1 M Sukrosa dalam PBS (gambar 4.2). Segera setelah pengemasan, *ministrav* langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Pada waktu pencelupan/ pembedaman (*plunging*), larutan diluen sukrosa berubah warna seperti susu, sedangkan medium vitrifikasi tetap transparan.



Keterangan :

a : diluen (1 M Sukrosa dalam PBS)

b : rongga udara

c : oosit dalam medium vitrifikasi

(satuan dalam cm)

Gambar 4.2. Skema pengemasan oosit dalam *straw* untuk proses vitrifikasi
(Sumber : Supriatna dan Pasaribu, 1992)

4.7.5. Pembagian Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial dengan 12 perlakuan dan 4 kali ulangan pada setiap kelompok perlakuan. Total oosit yang digunakan adalah 366 oosit hasil maturasi *in vitro* (Lampiran 1 dan 5).

Oosit dibagi dalam 12 kelompok perlakuan dan terhadap masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :

Kelompok 1. Krioprotektan EG+S waktu pemaparan 10 menit

Kelompok 2. Krioprotektan EG+S waktu pemaparan 20 menit

Kelompok 3. Krioprotektan EG+S waktu pemaparan 30 menit

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

Kelompok 7. Krioprotektan PROH+S waktu pemaparan 10 menit

Kelompok 8. Krioprotektan PROH+S waktu pemaparan 20 menit

Kelompok 9. Krioprotektan PROH+S waktu pemaparan 30 menit

Kelompok 10. Krioprotektan PROH+S+BSA waktu pemaparan 10 menit

Kelompok 11. Krioprotektan PROH+S+BSA waktu pemaparan 20 menit

Kelompok 12. Krioprotektan PROH+S+BSA waktu pemaparan 30 menit

Terhadap ke 12 kelompok tersebut dilakukan ulangan sebanyak 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 :

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

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

4.7.6. Pencairan Kembali (*Thawing*) Krioprotektan

Setelah dibekukan dan disimpan selama 2-4 minggu, dilakukan pencairan kembali dengan memasukkan *ministraw* ke dalam penangas air 30°C sampai kristal es dalam diluen hilang. Segera setelah hangat, seluruh isi *ministraw* dikeluarkan ke dalam cawan petri.

4.7.7. Pembilasan Krioprotektan

Oosit yang telah dikeluarkan dari minisraw dibilas 2 x dengan sukrosa 0,5 M (lampiran 13) untuk menghilangkan krioprotektan, seperti prosedur yang dilakukan oleh Sun *et al.* (1995).

4.7.8. Pemeriksaan Morfologi Oosit dengan Mikroskop Invert

Setelah mengalami pembilasan krioprotektan, oosit diperiksa di bawah mikroskop invert untuk diamati morfologinya dengan pembesaran 200 x dan 400 x. Kualitas oosit setelah pencairan kembali dan pembilasan krioprotektan ditentukan berdasarkan penilaian morfologis normal sebagai berikut : plasma membran intak, ooplasma bergranulasi homogen, zona pelusida dan ooplasma berbatas jelas. Sedangkan morfologi oosit yang tidak normal menunjukkan bentuk yang tidak teratur dan terjadi degenerasi dengan ooplasma gelap dan berfragmentasi.

4.7.9. Pemeriksaan Hidup – Mati Oosit dengan Mikroskop Fluoresen

Terhadap oosit yang telah diperiksa morfologinya, ditambahkan bahan pewarnaan propidium iodide, kemudian preparat ini diinkubasi dalam inkubator selama 30 menit. Preparat dilihat di bawah mikroskop fluoresen dengan pembesaran 200 x dan 400 x. Gambaran yang terlihat adalah bila oosit hidup, ooplasmanya tidak akan menyerap warna (putih) dan bila oosit mati, ooplasmanya berwarna merah.

4.8. Analisis Data

Untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing krioprotektan dan waktu pemaparan terhadap persentase morfologi dan hidup oosit, dilakukan uji statistik dengan menggunakan Analisis Varians (ANOVA). Bila terdapat perbedaan yang nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) (Steel dan Torie, 1991).

BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Persentase Oosit dengan Morfologi Normal

Persentase oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan yang berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA), dan dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tertera pada tabel-tabel berikut ini :

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

Krioprotektan	% Oosit dengan Morfologi Normal ($\bar{x} \pm SD$)
EG+S	91,04 ^a \pm 11,31
EG+S+BSA	95,30 ^a \pm 9,11
PROH+S	93,68 ^a \pm 8,16
PROH+S+BSA	93,15 ^a \pm 8,35

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, baik dengan menggunakan krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, maupun PROH+S+BSA adalah $91,04 \pm 11,31\%$, $95,30 \pm 9,11\%$, $93,68 \pm 8,16\%$, dan $93,15 \pm 8,35\%$. Setelah dianalisis dengan uji statistik Anava Dua Arah, maka dapat ditunjukkan bahwa antara masing-masing krioprotektan tersebut tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) (Lampiran 4).

Tabel 5.2. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit dengan 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	$95,48^a \pm 9,10$
20	$91,47^a \pm 10,27$
30	$92,93^a \pm 8,06$

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 $95,48 \pm 9,10\%$, $91,47 \pm 10,27\%$, dan $92,93 \pm 8,06\%$.

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 ($p > 0,05$) (lampiran 4).

Tabel 5.3. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan kombinasi macam krioprotektan (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+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
PROH+S	97,50 ^a \pm 5,00	88,54 ^a \pm 15,73	95,00 ^a \pm 10,00
PROH+S+BSA	100,00 ^a \pm 0,00	88,79 ^a \pm 9,39	90,66 ^a \pm 8,44

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 dengan morfologi normal setelah vitrifikasi pada masing-masing kelompok perlakuan yang menggunakan kombinasi krioprotektan EG+S,

EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

5.2. Persentase Oosit Hidup

Persentase oosit hidup setelah vitrifikasi dengan memberikan perlakuan macam krioprotektan yang berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA), dan dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tertera pada tabel-tabel berikut ini :

Tabel 5.4. Rata-rata persentase (\pm SD) oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan yang berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)

Krioprotektan	% Oosit Hidup ($\bar{x} \pm SD$)
EG+S	75,90 ^a \pm 12,61
EG+S+BSA	83,65 ^a \pm 14,47
PROH+S	86,38 ^a \pm 14,77
PROH+S+BSA	80,25 ^a \pm 18,14

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

Rata-rata persentase oosit hidup setelah vitrifikasi, baik dengan menggunakan krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, maupun PROH+S+BSA adalah $75,90 \pm 12,61\%$, $83,65 \pm 14,47\%$, $86,38 \pm 14,77\%$, dan $80,25 \pm 18,14\%$. Uji statistik dengan Anava Dua Arah menunjukkan bahwa antara masing-masing krioprotektan tersebut tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

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	$77,75^a \pm 16,04$
20	$83,68^a \pm 16,66$
30	$83,21^a \pm 12,74$

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

Rata-rata persentase oosit hidup setelah vitrifikasi, baik dengan lama waktu pemaparan 10, 20, maupun 30 menit adalah $77,75 \pm 16,04\%$, $83,68 \pm 16,66\%$, $83,21 \pm 12,74\%$. Analisis hasil statistik 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 ($p > 0,05$).

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

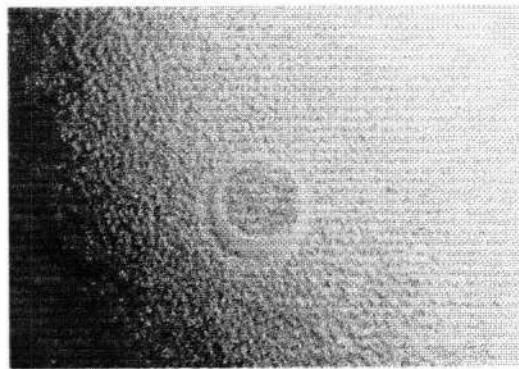
Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)		
	10	20	30
EG+S	67,92 ^a \pm 13,15	80,21 ^a \pm 16,45	79,58 ^a \pm 3,43
EG+S+BSA	79,61 ^a \pm 17,18	87,50 ^a \pm 14,73	83,84 ^a \pm 14,64
PROH+S	88,09 ^a \pm 8,02	86,45 ^a \pm 17,80	84,29 ^a \pm 20,41
PROH+S+BSA	75,00 ^a \pm 21,52	80,56 ^a \pm 22,90	85,08 ^a \pm 12,24

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

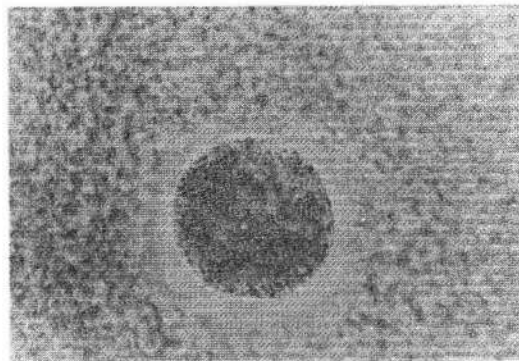
Dari tabel 5.6. diketahui rata-rata persentase oosit hidup setelah vitrifikasi, akibat kombinasi menggunakan krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+S+BSA dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

5.3. Hasil Pengamatan Mikroskopis

Hasil pengamatan terhadap morfologi normal oosit dengan mikroskop invert dan keadaan hidup-mati oosit dengan mikroskop fluoresen, diperlihatkan pada gambar-gambar yang tersaji berikut ini.

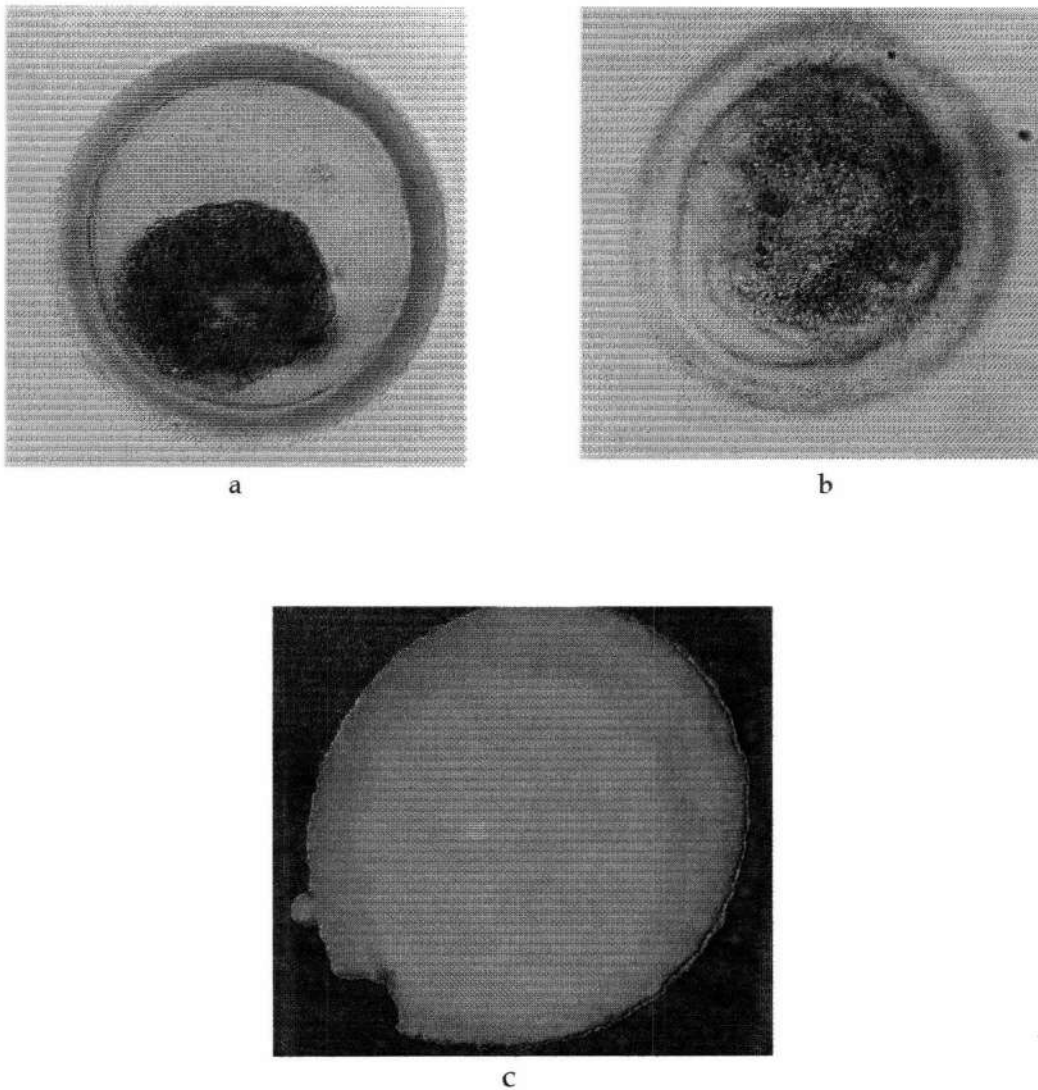


a

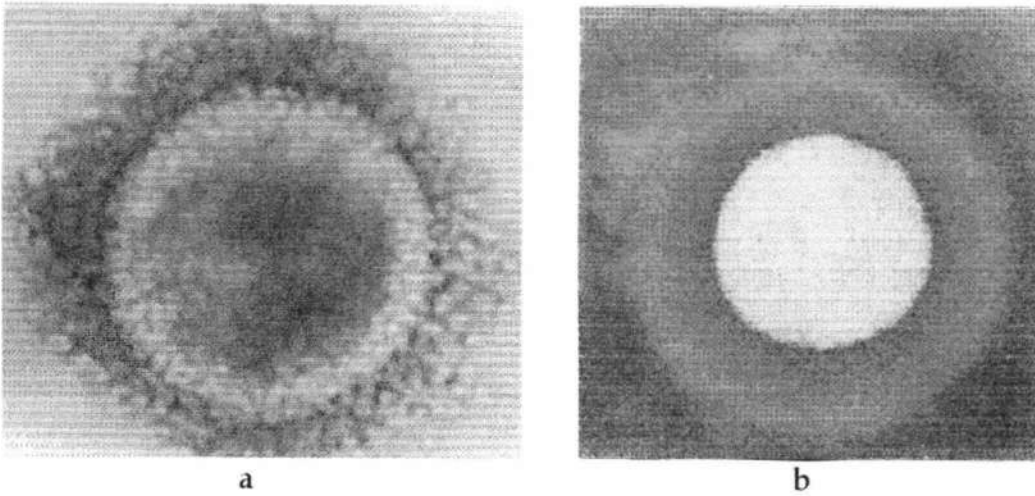


b

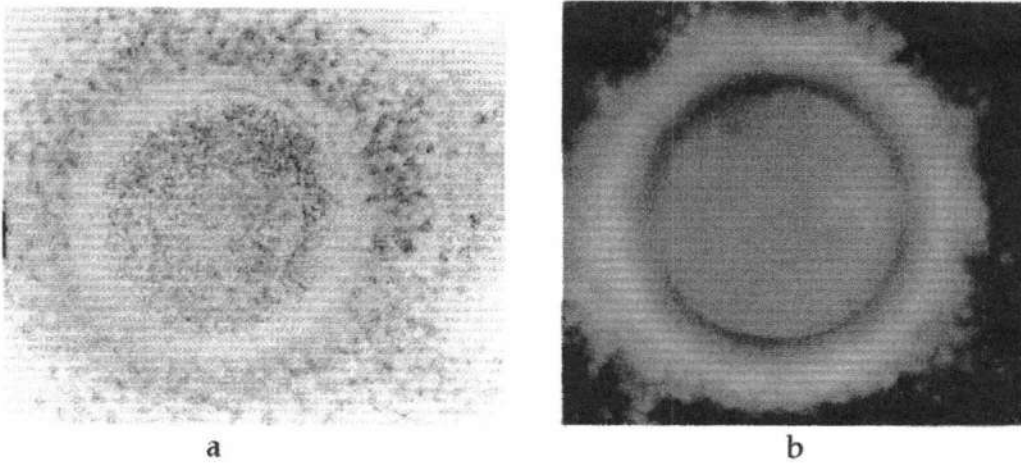
Gambar 5.1. Oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi. Oosit kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata longgar. Penampakan oosit dengan mikroskop invert pembesaran 200 x (a), dan pembesaran 400 x (b)



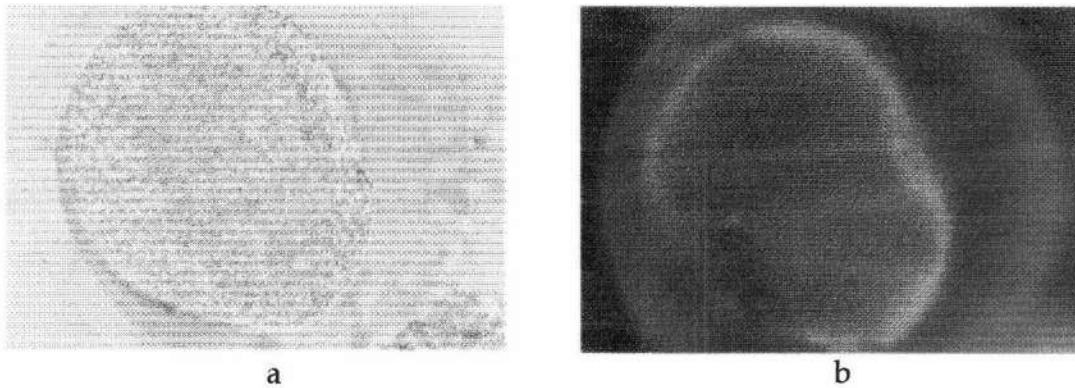
Gambar 5.2. Beberapa bentuk oosit yang mengalami degenerasi setelah proses vitrifikasi. Penggumpalan ooplasma (a), bentuk tidak bulat (b) (di bawah mikroskop invert), dan zona pelusida robek (c) (di bawah mikroskop fluoresen).



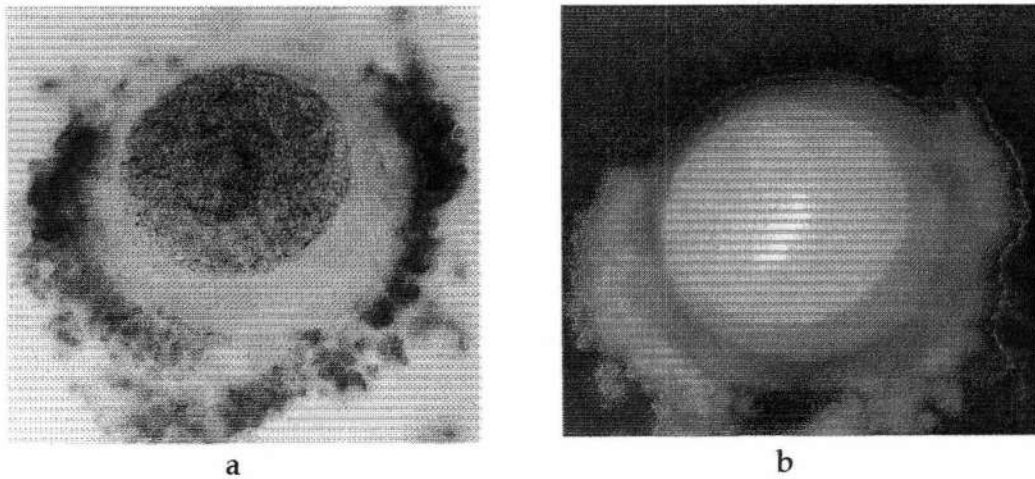
Gambar 5.3. Oosit dengan morfologi normal dan hidup setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop invert (a), dan mikroskop fluoresen (b)



Gambar 5.4. Oosit dengan morfologi normal tetapi mati setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop invert (a), dan mikroskop fluoresen (b)



Gambar 5.5. Oosit dengan morfologi tidak normal tetapi hidup setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop invert (a), dan mikroskop fluoresen (b)



Gambar 5.6. Oosit dengan morfologi tidak normal dan mati setelah vitrifikasi. Penampakan oosit dengan mikroskop invert (a), dan mikroskop fluoresen (b)

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Kondisi yang optimal untuk memvitrifikasi embrio dan oosit berbeda antar spesies, karena karakteristik sel, seperti ukuran, bentuk, sifat membran, dan sensitivitas terhadap krioprotektan akan berbeda. Pada beberapa embrio dan oosit, kerusakan osmotik menyebabkan embrio dari beberapa spesies tidak dapat dikriopreservasi secara efisien pada beberapa tahap perkembangan. Apalagi pada sel oosit yang lebih sensitif terhadap kriopreservasi daripada embrio. Kerusakan osmotik diduga menyebabkan vitrifikasi embrio atau oosit menjadi sulit untuk berhasil, karena dengan jelas pada sel normal, sesaat setelah dikembalikan ke kondisi semula pada larutan isotonik, dapat terlihat sel kehilangan kondisi normalnya dan terjadi degenerasi. Sel yang sudah dikriopreservasi lebih sensitif terhadap kerusakan osmotik daripada sel yang segar (Kasai, 1996).

Melihat kondisi yang demikian ini, pembekuan oosit merupakan sebuah tantangan bagi para ahli kriobiologis. Ukuran yang besar, adanya spindel pada metafase, dan sitoplasma yang spesifik pada tiap-tiap spesies, saat ini merupakan problem yang unik pada pembekuan dan pencairan kembali oosit (Nowshari, 1994).

6.1. Oosit dengan Morfologi Normal

6.1.1. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)

Metode vitrifikasi mempunyai problem utama yang berkaitan dengan toksisitas krioprotektan, karena material yang akan dibekukan ditempatkan dalam media hiperosmolaritas atau krioprotektan berkonsentrasi tinggi untuk mendapatkan kondisi bebas pembentukan kristal es dan larutan hiperosmolaritas ini dapat membeku seolah-oleh menjadi seperti kaca. Pada penelitian ini digunakan campuran 40% Etilen glikol (EG) ditambah dengan 0,3 M Sukrosa (S) dibandingkan dengan campuran 40% 1,2 Propanediol (PROH) + 0,3M Sukrosa. Pada tabel 5.1. terlihat bahwa ketika EG+S dibandingkan dengan PROH+S, ternyata kedua krioprotektan berkonsentrasi tinggi tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Sehingga dapat dikatakan bahwa kedua macam krioprotektan tersebut dapat digunakan dan mempunyai

kemampuan yang sama 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 lebih rendah (62,07) dibanding PROH (76,10), DMSO (78,13), dan gliserol (92,10), sehingga memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi. Beberapa peneliti juga mengatakan bahwa kelebihan EG sebagai krioprotektan adalah karena toksisitasnya yang rendah. Sedangkan mengenai PROH, hal yang sama juga dikatakan oleh Arav *et al.* (1993), bahwa PROH mempunyai permeabilitas yang tinggi dan efek toksisitasnya rendah. Penggunaan PROH sebagai krioprotektan dalam kriopreservasi oosit sapi juga dicoba oleh Otoi *et al.* (1993). Dibandingkan dengan DMSO dan gliserol, PROH menghasilkan oosit dengan morfologi normal lebih tinggi setelah pencairan kembali. Hal ini berkaitan pula dengan berat molekul PROH yang lebih rendah dibandingkan dengan DMSO dan gliserol. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), dibandingkan dengan

gliserol, maka PROH lebih unggul karena stabilitasnya lebih besar dalam keadaan tidak berbentuk (*wholly amorphous state*) dan kemampuan pembentukan kristal es rendah. Meskipun demikian, beberapa penelitian yang menggunakan EG dan PROH menunjukkan hasil yang berbeda, tergantung pada spesies, tahapan oosit yang dibekukan, dan konsentrasi krioprotektan.

Penambahan 6% Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro pada kedua formulasi krioprotektan (EG+S+BSA dan PROH+S+BSA) juga tidak memperlihatkan adanya pengaruh terhadap morfologi normal oosit ($P > 0,05$), baik antara EG+S dengan EG+S+BSA, PROH+S dengan PROH+S+BSA, ataupun EG+S+BSA dengan PROH+S+BSA.

Dikatakan oleh Leibo (1988) yang dikutip oleh Gordon (1994), bahwa BSA dapat melindungi membran sel pada fase *post thawing* dan memegang peranan penting dalam stabilisasi membran sel. Tetapi sementara itu 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. Hasil dari penelitian ini juga menunjukkan bahwa BSA tidak berpengaruh terhadap daya krioprotektif EG+S dan PROH+S, sehingga dapat dikatakan bahwa untuk proses vitrifikasi oosit sapi tidak diperlukan BSA sebagai tambahan makromolekul. Hal ini akan menguntungkan secara ekonomis berkaitan dengan harga BSA yang mahal.

6.1.2. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Tabel 5.2. menunjukkan bahwa lama waktu pemaparan oosit di dalam krioprotektan tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap kemampuan krioprotektan untuk mempertahankan morfologi normal oosit. Lama waktu pemaparan 10 menit tidak berbeda dengan 20 dan 30 menit, demikian juga dengan lama waktu pemaparan 20 menit yang tidak berbeda dengan 30 menit ($P > 0,05$). 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' memberikan hasil yang baik terhadap morfologi oosit tikus dibandingkan dengan waktu pemaparan 5' 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.

6.1.3. Rata-rata Persentase Oosit dengan Morfologi Normal Setelah Vitrifikasi dengan Kombinasi Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Tabel 5.3. memperlihatkan bahwa persentase rasio oosit dengan morfologi normal akibat kombinasi macam krioprotektan dengan lama waktu pemaparan 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 kemampuan fertilitas dari oosit, serta perkembangan selanjutnya sampai pada tahap blastosis.

6.2. Oosit Hidup

6.2.1. Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA)

Metode vitrifikasi dapat memberikan kontribusi untuk meningkatkan kemampuan hidup dan kapasitas berkembang sel oosit. Namun, perlu diingat bahwa untuk vitrifikasi diperlukan krioprotektan yang mempunyai konsentrasi tinggi yang dapat menimbulkan efek toksik terhadap oosit yang dibekukan. 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.

Ketika EG+S dibandingkan dengan PROH+S, ternyata kedua krioprotektan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$), sehingga dapat dikatakan bahwa kedua macam krioprotektan tersebut dapat digunakan dan mempunyai kemampuan yang sama untuk mempertahankan daya hidup oosit sapi setelah proses vitrifikasi. 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. Banyak peneliti juga melaporkan (Gordon, 1994), bahwa PROH memberikan daya tahan hidup yang baik, meskipun angka perkembangan setelah fertilisasi *in vitro* belum menunjukkan hasil yang menggembirakan.

Penambahan 6% Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai molekul makro pada kedua formulasi krioprotektan (EG+S+BSA dan PROH+S+BSA) juga tidak memperlihatkan adanya pengaruh terhadap morfologi normal oosit ($P > 0,05$), baik antara EG+S dengan EG+S+BSA, PROH+S dengan

PROH+S+BSA, ataupun EG+S+BSA dengan PROH+S+BSA. 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.

6.2.2. Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Tabel 5.4. menunjukkan bahwa lama waktu pemaparan oosit di dalam krioprotektan tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap daya hidup oosit. Lama waktu pemaparan 10 menit tidak berbeda dengan 20 dan 30 menit, demikian juga dengan lama waktu pemaparan 20 menit yang tidak berbeda dengan 30 menit ($P > 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan oosit tetap viabel.

Oleh karena beberapa penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya memperlihatkan adanya perbedaan hasil penelitian yang dilakukan antara satu peneliti dengan peneliti yang lain, maka harus dilakukan studi lebih lanjut

untuk mendapatkan waktu pemaparan yang optimal demi suksesnya vitrifikasi. 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.

6.2.3. Rata-rata Persentase Oosit Hidup Setelah Vitrifikasi dengan Kombinasi Macam Krioprotektan yang Berbeda (EG+S ; EG+S+BSA ; PROH+S ; PROH+S+BSA) dan Lama Waktu Pemaparan yang Berbeda (10 ; 20 ; 30 menit)

Tabel 5.6. memperlihatkan bahwa persentase rasio oosit hidup akibat kombinasi macam krioprotektan dengan

lama waktu pemaparan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa macam krioprotektan tidak berinteraksi dengan lama waktu pemaparan, karena masing-masing berpengaruh secara sendiri-sendiri terhadap daya hidup oosit setelah proses vitrifikasi. Seperti yang 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.

Secara keseluruhan, hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas oosit yang dilihat dari morfologi dan kemampuan hidup sel oosit setelah proses pembekuan dengan metode vitrifikasi, penyimpanan, pencairan kembali dan pembilasan krioprotektan, dapat dipertahankan dengan angka persentase yang baik. Apabila dilakukan perhitungan persentase secara menyeluruh, oosit dengan morfologi normal *post thawing* adalah sebesar 92,90% (340 dari 366) dan oosit yang hidup sebesar 82,51% (302 dari 366). Dengan demikian, metode vitrifikasi dapat digunakan sebagai kriopreservasi oosit dengan beberapa kelebihan yang menguntungkan, di antaranya karena jauh lebih sederhana, lebih mudah, lebih cepat, dan lebih murah. Tidak seperti pada pembekuan lambat dan

bertahap yang pelaksanaannya jauh lebih rumit, membutuhkan tahapan waktu tertentu, mahal karena membutuhkan peralatan pembekuan yang canggih. Kerusakan oosit karena terbentuknya kristal-kristal es intraseluler maupun ekstraseluler dapat dihindari pada vitrifikasi, karena suhu kritis dapat dilalui dengan sangat cepat, apalagi dibantu dengan metode *Open Pulled Straw* (OPS) yang dapat lebih mempersingkat kecepatan pembekuan. Oleh Vajta *et al.* (1998) dikatakan bahwa teknik OPS menawarkan cara baru yang dapat memecahkan problem mendasar pada kriobiologi reproduksi dan mempunyai dampak yang praktis pada bioteknologi dan teknologi bantu reproduksi pada manusia (*Human Assisted Reproduction Technology*). Penelitian yang dilakukan oleh Hochi *et al.* (2000) dengan teknik *Open-pulled Glass Capillary Tube* menunjukkan bahwa morfologi normal oosit sapi matang yang dibekukan dengan metode vitrifikasi adalah sebanyak 86% (n= 66). Lim *et al.* (1991) menganjurkan untuk melakukan seleksi terhadap metode *freezing* dan *thawing* yang paling tepat, agar bisa memberikan kontribusi untuk meningkatkan kemampuan hidup dan kapasitas perkembangan oosit yang dibekukan. Shaw *et al.* (2000) menyimpulkan bahwa pada akhirnya harus dikembangkan prosedur pembekuan yang cepat, sederhana, dan efektif untuk jaringan ovarium dan oosit di segala tahapan perkembangan,

karena prosedur pembekuan lambat dan bertahap dapat memberikan efek yang merugikan terhadap oosit.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

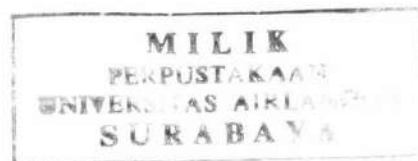
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Krioprotektan vitrifikasi Etilen Glikol atau 1,2 Propanediol yang masing-masing ditambah Sukrosa dapat digunakan dan mempunyai kemampuan yang sama-sama baik dalam menjaga viabilitas oosit pasca *thawing*. Penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) tidak berpengaruh terhadap kinerja kedua krioprotektan tersebut.
2. Lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi oosit tidak berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca *thawing*.
3. Kombinasi macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, dan PROH+S+BSA dengan lama waktu pemaparan krioprotektan 10, 20, dan 30 menit pada proses vitrifikasi oosit tidak berpengaruh terhadap viabilitas oosit pasca *thawing*.

7.2. Saran

1. Pada proses vitrifikasi oosit sapi yang matang dapat digunakan krioprotektan Etilen Glikol atau 1,2 Propanediol yang masing-masing ditambah Sukrosa dengan waktu pemaparan krioprotektan 10 menit, untuk mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.
2. Metode vitrifikasi dapat digunakan sebagai metode untuk kriopreservasi oosit.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Arav, A., D. Shedu, and M. Mattioli. 1993. Osmotic and Cytotoxic Study of Vitrification of Immature Bovine Oocytes. *Journal-Reprod-Fertil.* 99(2) : 353-358
- Arav, A., Y. Zeron, and A. Ocheretny. 2000. A New Device and Method for Vitrification Increase the Cooling Rate and Allows Successful Cryopreservation of Bovine Oocytes. *Theriogenology* 53 : 248.
- Aubard, Y., M.P. Teissier, and J.H. Baudet. 1994. Cryopreservation of the Ovary and Ovarian Tissue. *Rev-Fr-Gynecol-Obstet.* 89 (4) : 192-197.
- Baker, T.G. 1982. Oogenesis and Ovulation. In : Austin and Short (editor). *Reproduction in Mammals : 1. Germ Cells and Fertilization.* 2nd Edition. University Press, Cambridge. pp. 25-26.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction.* 3rd Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. p. 9.
- Dhali, A., R.S. Manik, S.K. Das, S.K. Singla, and P. Palta. 2000. Effect of Ethylene Glycol Concentration and Exposure Time on Post Vitrification Survival and In Vitro Maturation Rate of Buffalo Oocytes. *Theriogenology* 53 : 253.
- Fuku, E.J., J. Liu, and B.R. Downey. 1995^a. In Vitro Viability and Ultrastructural Changes in Bovine Oocytes Treated with a Vitrification Solution. *Mol-Reprod-Dev.* 40(2) : 177-185.
- Fuku, E.J., L. Xia, and B.R. Downey. 1995^b. Ultrastructural Changes in Bovine Oocytes Cryopreserved by Vitrification. *Cryobiology.* 32(2) : 139-156.

- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab International, Cambridge. pp. 117,134,300,302,313,317,325-326.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animal*. 6th. Edition. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 116,117,477,478,481.
- Hardjopranjoto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Edisi I. Airlangga University Press. hal. 33.
- Heap, R.B., and A.P.F. Flint. 1984. *Pregnancy*. In : Austin and Short (editor). *Reproduction in Mammals : 3. Hormonal Control of Reproduction*. 2nd Edition. University Press, Cambridge. p. 160.
- Hobo, A., S. Jager, and A. Toebosch. 1996. *The Oocyte/Theory*. In: M. Bras et al. (editor). *IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization*. N.V. Organon, Netherlands. pp. 77-78.
- Hochi, S., T. Fujimoto, and N. Oguri. 1995. *Viability of Immature Horse Oocytes Cryopreserved by Vitrification*. *Theriogenology* 42 : 236.
- Hochi, S., M. Akiyama, K. Kimura, and A. Hanada. 2000. *Vitrification of In Vitro-Matured Bovine Oocytes in Open-Pulled Glass Capillaries of Different Diameter*. *Theriogenology* 53 : 255.
- Hozumi, T. 2001^a. *Reproductive Physiology and Disorders*. Japan International Cooperation Agency. Indonesia. P. 7.
- Hozumi, T. 2001^b. *Reproductive Biology and Biotechnology*. Japan International Cooperation Agency. Indonesia. P. 47.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. (terjemahan). Penerbit ITB. Bandung. hal. 5-6.
- Hunter, J.E., B.J. Fuller, A. Bernard, A. Jackson, and R.W. Shaw. 1995. *Vitrification of Human Oocytes Following Minimal Exposure to*

- Cryoprotectants ; Initial Studies on Fertilization and Embryonic Development. *Hum-Reprod.* 10 (5) : 1184-1188.
- Ismudiono. 1996. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Edisi I. Laboratorium Fisiologi Reproduksi FKH - Unair, Surabaya. hal. 87-89.
- Johnson, M. and B. Everitt. 1988. *Essential Reproduction*. 3rd Edition. Blackwell Scientific Publications, Britain. pp. 76,79.
- Juniastutie, E. 1995. Morfologi Embrio Sapi Perah setelah Pembekuan dengan metode Vitrifikasi. Seminar. Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Surabaya. Hal. 13.
- Karja, N.W.K., S. Gustari, dan A. Budiyanto. 1999. Pengaruh Penambahan Fetal Bovine Serum pada Medium Maturasi Oosit terhadap Perkembangan Embrio Sapi Peranakan Ongole secara In Vitro. *Media Kedokteran Hewan.* 15 (4) : 248-253.
- Kasai, M. 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. *Animal Reproduction Sciences* 42 : 67-75.
- Kashiwazaki, N., H. Nagashima, R.J. Ashman, and M.B. Nottle. 1994. Cryopreservation of Porcine in Vivo and In Vitro Derived Blastocysts with Glycerol and Ethylene Glycol. *Proceedings of the Twenty-sixth Annual Conference the Australian Society of Reproductive Biology Inc.* p. 32.
- Kobayashi, K., H. Nagashima, H. Yamakawa, Y. Kato, and S. Ogawa. 1990. The Survival of Whole and Bisected Morulae after Cryopreservation by the Vitrification Method. *Theriogenology* 33 : 777-788.
- Le Gal, F. 1996. In Vitro Maturation and Fertilization of Goat Oocytes Frozen at the Germinal Vesicle Stage. *Theriogenology* 45 : 1177-1185.

- Leibo, S.P., A. Martino, S. Kobayashi, and J.W. Pollard. 1996. Stage-Dependent Sensitivity of Oocytes and Embryos to Low Temperatures. *Animal Reproduction Sciences* 42 : 45-53.
- Lim, J.M., Y. Fukui, and H. Ono. 1992. Developmental Competence of Bovine Oocytes Frozen at Various Maturation Stages Followed by In Vitro Maturation and Fertilization. *Theriogenology* 37 : 351-361.
- LIPI. 1994. Transfer Embrio dan Fertilisasi In Vitro pada Ternak Sapi. Pusat Analisa Perkembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (PAPIPTEK LIPI).
- Mc. Williams, R.B., W.E. Gibbons, and S.P. Leibo. 1995. Osmotic and Physiological Responses of Mouse Zygotes and Human Oocytes to Mono - and Disaccharides. *Hum-Reprod.* 10 (5) : 1163-1171.
- Naaktgeboren, N. 1996. Cryopreservation/Practice. In: M. Bras et al. (editor). *IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization*. N.V. Organon, Netherlands. pp. 249.
- Nagashima H., N. Kashiwazaki, R.J. Ashman, and M.B. Nottle. 1994. In Vitro and In Vivo Survival of Cryopreserved Hatched Blastocysts in Pigs. *Proceedings of the Twenty-sixth Annual Conference the Australian Society of Reproductive Biology Inc.* p. 31.
- 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.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Fisiologi Komperatif pada Hewan Domestikasi dan Laboratorium serta Manusia (terjemahan)*. UI - Press. hal. 22.

- 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. 1992. Developmental Capacity of Bovine Oocytes Cryopreserved after Maturation In Vitro and of Frozen-Thawed Bovine Embryos Derived from Frozen Mature Oocytes. *Theriogenology* 38 : 711-719.
- 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 Ethilene Glycol with Sucrose or Trehalose. *Journals of Reproduction and fertility Ltd.* 100 : 123-129.

- Saito, N., K. Imai, and M. Tomizawa. 1994. Effect of Sugars Addition in the Survival of Vitrified Bovine Blastocysts Produce In Vitro. *Theriogenology* 41 : 1053-1060.
- Schellander, K., J. Reli, F. Schmoll, and G. Brem. 1994. Effects of Different Cryoprotectants and Carbohydrates on Freezing of Matured and Unmatured Bovine Oocytes. *Theriogenology* 42 : 909-915.
- Schiewe, M.C., W.F. Rall, L.D. Stuart, and D.E. Wildt. 1991. Analysis of Cryoprotectant, Cooling Rate and In Situ Dilution Using Conventional Freezing or Vitrification for Cryopreserving Sheep Embryos. *Theriogenology* 36 : 279-293.
- Shaw, J.M., A. Oranratnachai, and A.O. Trounson. 2000. Fundamental Cryobiology of Mammalian Oocytes and Ovarian Tissue. *Theriogenology* 53 : 59-72.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. Dalam : B. Sumantri (penterjemah). Gramedia, Jakarta.
- Sukra, Y. 1995. Review on Embryo Transfer Technology Development and International Cooperation. Symposium on Biotechnology of Animal Reproduction. Bogor - Indonesia.
- Sun, Q.Y., Q.Z. Yang, G.Y. Liu, H.L. Feng, and P.C. Qin. 1995. Cryopreservations of Bovine Oocytes Matured In Vitro. *Theriogenology* 42 : 329.
- Supriatna, I. dan R.H. Pasaribu. 1992. In Vitro fertilisasi. Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Depdikbud Dirjen Dikti IPB. Hal. 4,7,8,105.
- Tada, N., M. Sato. E. Amann, and S. Ogawa. 1993. A Simple and Rapid Method for Cryopreservation of Mouse 2-Cell Embryos by Vitrification

- : Beneficial Effect of Sucrose and Raffinose on Their Cryosurvival Rate. *Theriogenology* 40 : 333-344.
- Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P.J. Booth, H. Jacobsen, T. Greeve, and H. Callesen. 1998. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification : A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Mol-Reprod-Dev.* 51(1) : 53-58.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of Bovine Oocytes and Embryo. Embryo Technology Center, Danish Institute of Agricultural Sciences, DK-8830 Tjele, Denmark.
- 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

Lampiran 1. Data jumlah oosit dengan hasil pengamatan oosit morfologi normal pada perlakuan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

	krioprot	waktu	n1	n2	n3	n4
1	EG+S	10	10	8	6	6
2	EG+S	20	6	8	6	6
3	EG+S	30	10	6	5	8
4	
5	P+ S	10	10	6	7	6
6	P+ S	20	8	8	6	6
7	P+ S	30	5	9	5	7
8	
9	EG+S+BS	10	7	8	11	5
10	EG+S+BS	20	14	8	8	7
11	EG+S+BS	30	6	9	8	11
12	
13	P+S+BSA	10	8	5	6	6
14	P+S+BSA	20	12	9	6	7
15	P+S+BSA	30	16	9	7	5

Oosit Morfologi Normal

	krioprot	waktu	n1	n2	n3	n4
1	EG+S	10	9	6	6	5
2	EG+S	20	4	7	6	6
3	EG+S	30	10	5	5	8
4	
5	P+ S	10	9	6	7	6
6	P+ S	20	7	8	5	5
7	P+ S	30	7	9	4	7
8	
9	EG+S+BSA	10	7	8	8	5
10	EG+S+BSA	20	14	8	8	7
11	EG+S+BSA	30	5	9	7	11
12	
13	P+S+BSA	10	8	5	6	6
14	P+S+BSA	20	11	7	6	6
15	P+S+BSA	30	11	8	7	4

Lampiran 2. Persentase oosit dengan morfologi normal setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)			Mean :	SD :
	10	20	30		
EG+S	90 75 100 100	66.67 87.5 100 100	90 83.33 100 100	91.04167	11.30972
EG+S+BSA	100 100 72.73 100	100 100 100 100	83.33 100 87.5 100	95.29667	9.107118
PROH+S	90 100 100 100	87.5 100 83.33 83.33	100 100 80 100	93.68	8.161545
PROH+S+BSA	100 100 100 100	91.67 77.78 100 85.71	93.75 88.89 100 80	93.15	8.348903
Mean : SD :	95.48313 9.10025	91.46813 10.26905	92.925 8.056601		

Lampiran 3. Daftar Anava persentase oosit dengan morfologi normal setelah ditransformasikan ke tabel Arcus Sinus

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)			Mean :	SD :
	10	20	30		
EG+S	71.56 60 60 90	54.76 69.3 90 90	71.56 65.88 90 90	77.755	13.59448
EG+S+BSA	90 90 58.5 90	90 90 90 90	65.88 90 69.3 90	83.64	11.74393
PROH+S	71.56 90 90 90	69.3 90 65.88 65.88	100 100 80 100	80.505	11.89211
PROH+S+BSA	90 90 90 90	73.36 61.89 90 67.78	75.7 70.54 90 63.44	79.3925	11.67428
Mean : SD :	83.85125 11.45252	78.00938 12.96862	79.10875 11.62816		

Lampiran 4. Statistik deskriptif dan Univariate Analysis of Variance **oosit morfologi normal** setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

Between-Subjects Factors

	N
1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA	12
	12
	12
	12
1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit)	16
	16
	16

Descriptive Statistics

Dependent Variable: NORMAL

1 = EG+S, 2 = P+S, 3 =	1 = 10, 2 = 20,	Mean	Std. Deviation	N
1	10	77.8900	14.7583	4
	20	76.0150	17.2049	4
	30	79.3600	12.5029	4
	Total	77.7550	13.5945	12
2	10	85.3900	9.2200	4
	20	72.7650	11.6026	4
	30	83.3600	13.2800	4
	Total	80.5050	11.8921	12
3	10	82.1250	15.7500	4
	20	90.0000	.0000	4
	30	78.7950	13.0135	4
	Total	83.6400	11.7439	12
4	10	90.0000	.0000	4
	20	73.2575	12.1043	4
	30	74.9200	11.2397	4
	Total	79.3925	11.6743	12
Total	10	83.8512	11.4525	16
	20	78.0094	12.9686	16
	30	79.1087	11.6282	16
	Total	80.3231	12.0520	48

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NORMAL

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Intercept	Hypothesis	309686.612	1	309686.612
	Error	308.413	2	154.206 ^a
KRIOPROT	Hypothesis	221.953	3	73.984
	Error	1027.279	6	171.213 ^b
WAKTU	Hypothesis	308.413	2	154.206
	Error	1027.279	6	171.213 ^b
KRIOPROT * WAKTU	Hypothesis	1027.279	6	171.213
	Error	5269.158	36	146.366 ^c

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NORMAL

Source		F	Sig.
Intercept	Hypothesis	2008.259	.000
	Error		
KRIOPROT	Hypothesis	.432	.738
	Error		
WAKTU	Hypothesis	.901	.455
	Error		
KRIOPROT * WAKTU	Hypothesis	1.170	.344
	Error		

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

Expected Mean Squares^{a,b}

Source	Variance Component			Quadratic Term
	Var(WAKTU)	Var(KRIOPRO T * WAKTU)	Var(Error)	
Intercept	16.000	4.000	1.000	Intercept, KRIOPROT
KRIOPROT	.000	4.000	1.000	KRIOPROT
WAKTU	16.000	4.000	1.000	
KRIOPROT * WAKTU	.000	4.000	1.000	
Error	.000	.000	1.000	

- a. For each source, the expected mean square equals the sum of the coefficients in the cells times the variance components, plus a quadratic term involving effects in the Quadratic Term cell.
- b. Expected Mean Squares are based on the Type III Sums of Squares.

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable: NORMAL

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
80.323	1.746	76.782	83.865

2. 1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA

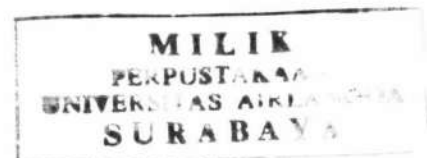
Univariate Tests

Dependent Variable: NORMAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	221.953	3	73.984	.505	.681
Error	5269.158	36	146.366		

The F tests the effect of 1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. 1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit)



Univariate Tests

Dependent Variable: NORMAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	308.413	2	154.206	1.054	.359
Error	5269.158	36	146.366		

The F tests the effect of 1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (merit). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Lampiran 5. Data jumlah oosit dengan hasil pengamatan oosit hidup pada perlakuan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

	krioprot	waktu	n1	n2	n3	n4
1	EG+S	10	10	8	6	6
2	EG+S	20	6	8	6	6
3	EG+S	30	10	6	5	8
4						
5	P+ S	10	10	6	7	6
6	P+ S	20	8	8	6	6
7	P+ S	30	5	9	5	7
8						
9	EG+S+BS	10	7	8	11	5
10	EG+S+BS	20	14	8	8	7
11	EG+S+BS	30	6	9	8	11
12						
13	P+S+BSA	10	8	5	6	6
14	P+S+BSA	20	12	9	6	7
15	P+S+BSA	30	16	9	7	5

Oosit Hidup

	krioprot	waktu	n1	n2	n3	n4
1	EG+S	10	8	6	4	3
2	EG+S	20	4	7	6	4
3	EG+S	30	8	5	4	6
4						
5	P+ S	10	10	5	6	5
6	P+ S	20	5	8	5	6
7	P+ S	30	5	9	4	4
8						
9	EG+S+BSA	10	6	8	8	3
10	EG+S+BSA	20	11	8	8	5
11	EG+S+BSA	30	4	7	8	10
12						
13	P+S+BSA	10	4	5	4	5
14	P+S+BSA	20	12	5	4	7
15	P+S+BSA	30	16	8	5	4

Lampiran 6. Persentase oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)			Mean :	SD :
	10	20	30		
EG+S	80 75 66.67 50	66.67 87.5 100 66.67	80 83.33 80 75	75.90333	12.60957
EG+S+BSA	85.71 100 72.72 60	78.57 100 100 71.43	66.67 77.78 100 90.91	83.64917	14.46922
PROH+S	100 83.83 85.71 83.33	62.5 100 83.33 100	100 100 80 57.41	86.38417	14.77251
PROH+S+BSA	50 100 66.67 83.33	100 55.56 66.67 100	100 88.89 71.43 80	80.25417	18.13851
Mean :	77.74813	83.68125	83.21375		
SD :	16.04464	16.6586	12.74171		

Lampiran 7. Daftar Anava persentase oosit hidup setelah ditransformasikan ke tabel Arcus Sinus

Krioprotektan	Lama Waktu Pemaparan (menit)			Mean :	SD :
	10	20	30		
EG+S	63.44 60 54.76 90	54.76 69.3 90 54.76	63.44 65.88 63.44 60	Mean : 62.065	SD : 10.9244
EG+S+BSA	67.78 90 58.5 50.77	62.44 90 90 57.67	54.76 61.89 90 72.44	Mean : 70.52083	SD : 15.42395
PROH+S	90 65.88 65.88 65.88	52.24 90 65.88 90	90 90 63.44 49.26	Mean : 73.36333	SD : 15.69223
PROH+S+BSA	45 90 54.76 65.88	90 48.16 54.76 90	90 70.54 57.67 63.44	Mean : 68.35083	SD : 17.44131
Mean : SD :	64.71438 14.54503	71.87313 17.24275	69.1375 13.57365		

Lampiran 8. Statistik deskriptif dan Univariate Analysis of Variance oosit hidup setelah vitrifikasi dengan macam krioprotektan EG+S, EG+S+BSA, PROH+S, PROH+S+BSA dan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit

Between-Subjects Factors

	N
1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA	12
1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit)	16
	16
	16

Descriptive Statistics

Dependent Variable: HIDUP

1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA	1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit)	Mean	Std. Deviation	N
1	10	55.8000	8.0360	4
	20	67.2050	16.6709	4
	30	63.1900	2.4178	4
	Total	62.0650	10.9244	12
2	10	72.3850	11.7774	4
	20	74.5300	18.7110	4
	30	73.1750	20.2720	4
	Total	73.3633	15.6922	12
3	10	66.7625	16.9808	4
	20	75.0275	17.3981	4
	30	69.7725	15.3164	4
	Total	70.5208	15.4240	12
4	10	63.9100	19.3725	4
	20	70.7300	22.4136	4
	30	70.4125	14.0792	4
	Total	68.3608	17.4413	12
Total	10	64.7144	14.5450	16
	20	71.8731	17.2427	16
	30	69.1375	13.5736	16
	Total	68.5750	15.1688	48

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HIDUP

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Intercept	Hypothesis	225721.470	1	225721.470
	Error	417.575	2	208.788 ^a
KRIOPROT	Hypothesis	829.737	3	276.579
	Error	118.089	6	19.682 ^b
WAKTU	Hypothesis	417.575	2	208.788
	Error	118.089	6	19.682 ^b
KRIOPROT * WAKTU	Hypothesis	118.089	6	19.682
	Error	9448.883	36	262.469 ^c

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HIDUP

Source		F	Sig.
Intercept	Hypothesis	1081.105	.001
	Error		
KRIOPROT	Hypothesis	14.053	.004
	Error		
WAKTU	Hypothesis	10.608	.011
	Error		
KRIOPROT * WAKTU	Hypothesis	.075	.998
	Error		

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

Expected Mean Squares^{a,b}

Source	Variance Component			
	Var(WAKTU)	Var(KRIOPRO T * WAKTU)	Var(Error)	Quadratic Term
Intercept	16.000	4.000	1.000	Intercept, KRIOPROT
KRIOPROT	.000	4.000	1.000	KRIOPROT
WAKTU	16.000	4.000	1.000	
KRIOPROT * WAKTU	.000	4.000	1.000	
Error	.000	.000	1.000	

- a. For each source, the expected mean square equals the sum of the coefficients in the cells times the variance components, plus a quadratic term involving effects in the Quadratic Term cell.
- b. Expected Mean Squares are based on the Type III Sums of Squares.

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable: HIDUP

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
68.575	2.338	63.833	73.317

2. 1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA

Univariate Tests

Dependent Variable: HIDUP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	829.737	3	276.579	1.054	.381
Error	9448.883	36	262.469		

The F tests the effect of 1 = EG+S, 2 = P+S, 3 = EG+S+BSA, 4 = P+S+BSA. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. 1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit)

Univariate Tests

Dependent Variable: HIDUP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	417.575	2	208.788	.795	.459
Error	9448.883	36	262.469		

The F tests the effect of 1 = 10, 2 = 20, 3 = 30 (menit). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Lampiran 9. Medium Koleksi Ovarium

1. NaCl fisiologis (NaCl 0,9%)
2. Gentamycin Sulfat 50 µg

Gunakan pada suhu 30 - 35°C

Lampiran 10. Medium Aspirasi Oosit

Phosphat Buffer Saline 100 ml

1. PBS Powder 0,96 gram
2. Glucose 0,1 gram
3. Natrium Pyruvat 0,0036 gram
4. Metal Solution 0,1 ml

(Penambahan *Metal Solution* harus dilakukan dengan *magnetic stirrer*)

5. Gentamycin Sulfat 0,03 ml

----- campur sampai merata

6. Bovine Serum albumin (BSA) 0,3% (0,15 gram/100 ml) ditaburkan di atas permukaan medium, tanpa diaduk
6. Filtrasi dengan mikrofilter 0,2 µm
7. Simpan dalam lemari es (4°C)Gunakan pada suhu 37- 38°C (*waterbath*)

Lampiran 11. **Medium Maturasi/ Pematangan**

Tissue Culture Medium/TCM 199	100 ml
-------------------------------	--------

TCM 199 Powder	9,9 gram
----------------	----------

Distilled Water (DW)	50,0 ml
----------------------	---------

----- campur sampai merata

NaHCO ₃	0,22 gram
--------------------	-----------

DW	10,0 ml
----	---------

----- campur sampai merata

Serum (5-10%)	5 - 10 ml
---------------	-----------

Gentamycin 50 µg/µl	1.0 µl/ml
---------------------	-----------

Tambahkan DW sampai mencapai 100,00 ml

----- campur sampai merata

Filter menggunakan mikrofilter 0,2 µm

Tuang dalam cawan petri 35 mm (2 - 2,5 ml/dish)

Tutup dengan parafin oil/mineral oil steril

Gassing dalam inkubator CO₂ 5% selama 1 malam (min. 1 jam)

Lampiran 12. **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

1,2 Propanediol / PROH (p.a. Merck®)

Nama lain	: Propylen Glycol
Rumus kimia	: $C_3H_8O_2$
Berat Molekul	: 78,10 g/mol
Berat jenis	: 1,03 kg/l

Medium vitrifikasi :

40% Etilen Glikol	= 40 ml EG + 60 ml PBS
40% 1,2 Propanediol	= 40 ml PROH + 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 13. Medium Pembilasan Kriprotektan

$$\begin{aligned} \text{Sukrosa 0,5 M} &= 0,5 \times 342,3 \text{ (BM Sukrosa)} \\ &= 171,15 \text{ g/1 liter PBS} \\ &= 17,115 \text{ g/ 100 ml PBS} \end{aligned}$$