

SKRIPSI

PERBANDINGAN PENGGUNAAN MEDIUM M 16 DAN *Human Tubal Fluid* (HTF) TERHADAP ANGKA FERTILISASI DAN PERKEMBANGAN EMBRIO MENCIT (*Mus musculus*) TAHAP DUA SEL



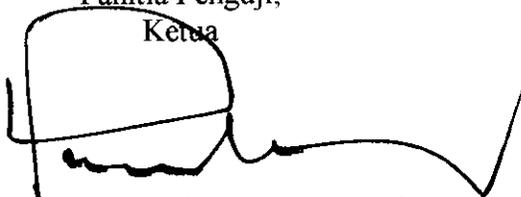
Oleh :

SRI ENDAH PUSPORINI
NGANJUK-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**

Menyetujui
Panitia Penguji,
Ketua



Prof. Dr. Soehartojo. H., M.Sc., Drh



Rochmah Kurnijasanti, M.Kes., Drh
Sekretaris



Tatik Hernawati, M.Si., Drh
Anggota



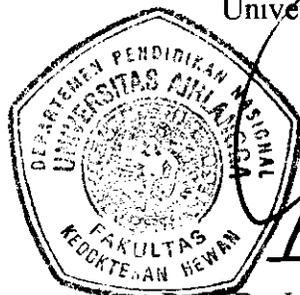
Widjiati, M.Si., Drh
Anggota



Dr. M. Zainal Arifin, M.S., Drh
Anggota

Surabaya, 31 Oktober 2003
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh
NIP. 130 697 297

**PERBANDINGAN PENGGUNAAN MEDIUM M16 DAN
Human Tubal Fluid (HTF) TERHADAP ANGKA FERTILISASI
DAN PERKEMBANGAN EMBRIO MENCIT
(*Mus musculus*) TAHAP DUA SEL**

Sri Endah Pusporini

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan angka fertilisasi dan perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*) tahap dua sel pada medium M16 dan medium HTF yang dikultur secara *in vitro*. Medium M16 adalah medium yang digunakan untuk fertilisasi dan kultur *in vitro* pada mencit. Medium HTF adalah medium untuk fertilisasi dan kultur *in vitro* pada manusia. Kedua medium tersebut mempunyai komposisi dasar yang relatif sama.

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina, mencit jantan vasektomi dan mencit jantan normal berumur tiga bulan dengan strain BALB-C. Sel telur didapat melalui superovulasi dengan menggunakan hormon PMSG dan hCG 5 IU secara intraperitoneal. Mencit betina tersebut dicampur dengan mencit jantan vasektomi secara monomating untuk melakukan gertak birahi. Tujuh belas jam kemudian dilakukan koleksi sel telur pada betina yang positif terdapat sumbat vagina. Spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* diambil dari bagian kauda epididimis pejantan normal. Sel telur dan spermatozoa yang diperoleh difertilisasi secara *in vitro* pada masing-masing medium kultur. Lima jam kemudian dilakukan pengamatan untuk menghitung jumlah sel telur yang berhasil difertilisasi pada masing-masing medium kultur, dilanjutkan dengan kultur *in vitro* pada masing-masing medium kultur untuk mengamati perkembangan embrio tahap dua sel. Pengamatannya dilakukan 24 jam kemudian. Data yang diperoleh terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel dianalisis dengan Uji t.

Persentase angka fertilisasi yang diperoleh pada medium M16 76,89 % dan pada medium HTF 78,65 %. Untuk perkembangan embrio tahap dua sel diperoleh persentase pada medium M16 67,91 % dan medium HTF 66,82 %. Dengan melakukan analisis statistik terhadap hasil yang diperoleh terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel yang dikultur pada medium M16 dan medium HTF tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Perbandingan Penggunaan Medium M16 Dan *Human Tubal Fluid* (HTF) Terhadap Angka Fertilisasi dan Perkembangan Embrio Mencit (*Mus musculus*) Tahap Dua Sel”**.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. serta kepada Ibu Widjiati, M.Si., Drh sebagai pembimbing pertama dan Bapak Dr. M. Zainal Arifin, M.S., Drh sebagai pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Soehartojo. H., M.Sc., Drh sebagai ketua penguji, Ibu Rochmah Kurniasanti, M.Kes., Drh dan Ibu Tatik Hernawati, M.Si., Drh sebagai anggota penguji.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada dr. Taufik Hidayat yang telah memberikan fasilitas dan kesempatan kepada penulis untuk bergabung dalam melaksanakan penelitian ini. Kepada Bapak dan Ibu Tercinta serta adik-adikku (Hana, Ulfa, Ghaniy) yang selalu memberikan dorongan moral dan materiil serta doa restunya sehingga terselesaikannya penulisan makalah skripsi ini, juga kepada Da Agus atas keyakinan dan dorongan semangat **“Keep Fight”** yang diberikan.

Untuk Diah, Izza, Ririn, Titik, Yuyun, Bobby, Reni, Mbak Dini, Mas Supri, Taufik, teman-teman di MP4, dan rekan-rekan angkatan'99 serta yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu namun telah banyak memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung juga penulis sampaikan terima kasih.

Penulis menyadari bahwa masih ada kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan demi sempurnanya penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis hanya dapat mendoakan semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis.

Surabaya, Oktober 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Landasan Teori	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	5
1.6. Hipotesis Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan Tentang Medium M16.....	6
2.2. Tinjauan Tentang Medium <i>Human Tubal Fluid</i> (HTF).....	7
2.3 . Superovulasi	7
2.4. Sel Telur	9
2.5. Spermatozoa	11
2.6. Teknik <i>Flushing</i> Sel Telur Mencit.....	13
2.7. Fertilisasi	14
2.8. Fertilisasi <i>In Vitro</i>	16
2.9. Medium Kultur <i>In Vitro</i>	17

BAB III MATERI DAN METODE	21
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2. Bahan dan Materi Penelitian	21
3.2.1. Materi Penelitian	21
3.2.2. Bahan Penelitian	21
3.2.3. Peralatan Penelitian	21
3.3. Metode Penelitian	22
3.3.1. Vasektomi.....	22
3.3.2. Persiapan Medium.....	23
3.3.3. Koleksi Sel Telur.....	23
3.3.4. <i>Flushing</i> Sel Telur.....	24
3.3.5. Koleksi Spermatozoa	25
3.3.6. Fertilisasi dan Kultur <i>In Vitro</i>	26
3.4. Pengamatan.....	26
3.5. Analisa Data.....	27
BAB IV HASIL PENELITIAN	29
4.1. Angka Fertilisasi	29
4.2. Perkembangan Embrio Tahap Dua Sel	32
BAB V PEMBAHASAN	35
5.1. Angka Fertilisasi	35
5.2. Perkembangan Embrio Tahap Dua Sel	38

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
6.1. Kesimpulan.....	44
6.2. Saran.....	44
RINGKASAN.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Data Hasil Pengamatan Sel Telur Yang Terfertilisasi Pada Medium HTF dan Medium M16	29
Tabel 2 : Rata-Rata Persentase Sel Telur Yang Terfertilisasi Pada Medium M16 dan Medium HTF	30
Tabel 3 : Data Hasil Pengamatan Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Pada Medium HTF dan Medium M16	32
Tabel 4 : Rata-Rata Persentase Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Yang Dikultur Pada Medium M16 dan Medium HTF.....	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1: Rancangan Penelitian	28
Gambar 2: Testis dan Kauda Epididimis Mencit	29
Gambar 3: Uterus dan Tuba Falopii Mencit.....	29
Gambar 4: Diagram Batang Rata-Rata Persentase Sel Telur Yang Terfertilisasi Pada Medium HTF dan Medium M16	30
Gambar 5: Sel Telur Mencit	31
Gambar 6: Sel Telur Mencit Yang Mengalami Proses Fertilisasi dan Terdapat Bentukan Polar Body II	31
Gambar 7: Kantung Fertilisasi Pada Tuba Falopii Mencit.....	31
Gambar 8: Diagram Batang Rata-Rata Persentase Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Yang Dikultur Pada Medium HTF dan Medium M16	34
Gambar 9: Morfologi Embrio Yang Dapat Berkembang Menjadi Tahap Dua Sel.....	34
Gambar 10: Morfologi Embrio Yang Mengalami Degenerasi.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Analisis Statistik Angka Fertilisasi Dengan Uji t	51
Lampiran 2 : Analisis Statistik Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Dengan Uji t	53
Lampiran 3 : Komposisi Medium M16	55
Lampiran 4 : Komposisi Medium HTF	56
Lampiran 5 : Pengenceran Hormon	57
Lampiran 6 : Dokumentasi Penelitian.....	58

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Pesatnya perkembangan bioteknologi pada saat ini sejalan dengan tingkat kebutuhan manusia diberbagai bidang mulai dari bidang pertanian, perikanan, peternakan, pengobatan dan kesehatan. Menurut Gordon (1994); Nienmann dan Kuess (2000) seperti yang dikutip oleh Nalley (2001) bahwa bioteknologi bermanfaat bagi kehidupan manusia dalam meningkatkan kesejahteraan dan perbaikan hidupnya. Salah satu penggunaan bioteknologi adalah dalam bidang peternakan. Penggunaan bioteknologi guna meningkatkan produksi peternakan meliputi : (1) teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan, transfer embrio, kriopreservasi embrio, fertilisasi *in vitro*, *sexing* sperma maupun kloning embrio dan spliting, (2) rekayasa genetika, (3) peningkatan efisiensi dan kualitas pakan, dan (4) bioteknologi yang berkaitan dengan dengan bidang veteriner lainnya.

Teknologi reproduksi yang telah banyak dikembangkan adalah transfer embrio berupa teknik *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET) untuk menghasilkan anak (embrio) yang banyak dalam satu siklus reproduksi. Untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*, metode bioteknik yang sering terlibat dalam pelaksanaan transfer embrio adalah fertilisasi *in vitro* dan pembekuan embrio (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Beberapa embrio seperti embrio kelinci, mencit, manusia, babi, sapi dan domba telah berhasil diproduksi melalui fertilisasi *in vitro* (Hafez, 1993).

Dalam proses fertilisasi *in vitro* banyak faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan proses fertilisasi *in vitro*. Menurut Sukra dkk (1993) faktor-faktor tersebut antara lain maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa dan kondisi fisiologis medium kultur. Untuk mengatasi faktor-faktor tersebut yang harus dipahami adalah pemahaman pada prinsip-prinsip dasar tentang maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa dan pertumbuhan embrio dalam medium kultur.

Selama fertilisasi *in vitro*, embrio ditempatkan di dalam medium kultur buatan yang mengandung zat-zat nutrisi yang dibutuhkan pada setiap perkembangannya. Komposisi zat-zat nutrisi dalam medium kultur dibuat mendekati komposisi nutrisi, elektrolit dan makromolekul yang ada di dalam saluran reproduksi betina. Pada dasarnya medium kultur dibuat berdasarkan kebutuhan nutrisi maupun lingkungan yang optimal untuk menjamin kelangsungan hidup (viabilitas) embrio serta dapat berkembang secara *in vitro*. Menurut Rijnders (1996) unsur-unsur yang diperlukan dalam medium untuk kultur *in vitro* adalah substrat (sumber energi dan sumber protein), larutan *buffer*, pH, osmolaritas, suhu, udara dan air. Unsur lain yang biasa ditambahkan ke dalam medium kultur adalah serum.

Medium kultur yang digunakan untuk kultur *in vitro* pada mencit adalah medium M16. Komposisi dasar dari medium ini relatif sama dengan komposisi pada medium *Human Tubal Fluid* (HTF) yang merupakan medium kultur untuk kultur *in vitro* pada manusia. Supriatna dan Pasaribu (1992) menyatakan bahwa sel telur mencit yang difertilisasi secara *in vitro* pada medium kultur angka fertilisasi rata-rata biasanya lebih besar atau sama dengan 60 %. Penelitian yang

dilakukan oleh Quinn *et al* (1985) menyatakan bahwa medium HTF dapat meningkatkan angka kehamilan pada fertilisasi *in vitro* manusia. Hal inilah yang mendorong penulis untuk meneliti perbandingan penggunaan medium kultur M16 dan *Human Tubal Fluid* (HTF) pada fertilisasi *in vitro* mencit ditinjau dari perolehan angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas maka dapat dirumuskan permasalahannya yaitu “ Apakah terdapat perbedaan penggunaan medium M16 dan *Human Tubal Fluid* (HTF) terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio mencit tahap dua sel ? ”

1.3. Landasan Teori

Dalam pelaksanaan transfer embrio tahapan awal yang harus dilakukan untuk menyediakan embrio dalam jumlah banyak adalah melalui fertilisasi *in vitro*. Secara alamiah proses fertilisasi terjadi di dalam ampula yang melibatkan dua jenis sel gamet yaitu spermatozoa dan sel telur. Kedua sel gamet sebelum bertemu telah mengalami serangkaian proses pematangan, pada spermatozoa disebut kapasitasi dan pada sel telur disebut maturasi. Kondisi alamiah yang ada di dalam saluran reproduksi betina sangat mendukung terjadinya fertilisasi. Pada kondisi *in vitro*, seluruh kondisi lingkungan baik fisik maupun kimiawi berada di dalam suatu sistem biakan sel yang diatur mendekati keadaan *in vivo* agar memungkinkan terjadinya fusi kedua jenis gamet berlangsung hingga perkembangan embrio selanjutnya.

Seperti yang dikutip oleh Hunter (1995) tentang penelitian yang dilakukan oleh Whitten (1957) dan Brinster (1963) bahwa embrio mencit tahap dua sel terbukti dapat dibiakkan sepenuhnya secara *in vitro* dan dapat berkembang baik dalam medium kultur. Menurut Bradley (1987) medium yang direkomendasikan untuk medium kultur embrio mencit adalah medium M16. Quinn *et al* (1985) telah melakukan penelitian tentang penggunaan medium kultur yang komposisinya berasal dari modifikasi cairan tuba manusia (*human tubal fluid/HTF*) dapat meningkatkan angka kehamilan pada fertilisasi *in vitro* manusia. Ditinjau dari komposisi dasar kedua medium yang relatif sama maka perlu diteliti lebih lanjut tentang penggunaan medium kultur untuk fertilisasi dan kultur *in vitro* mencit.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui perbedaan penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap angka fertilisasi pada mencit.
2. Mengetahui perbedaan penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap perkembangan embrio mencit tahap dua sel.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah dalam bidang bioteknologi reproduksi tentang penggunaan medium kultur yang baik dan sesuai terutama untuk fertilisasi dan kultur *in vitro* mencit.

1.6. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas maka hipotesis penelitian yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap angka fertilisasi.
2. Terdapat perbedaan penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap perkembangan embrio mencit tahap dua sel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Medium M16

Medium M16 adalah medium yang merupakan modifikasi dari larutan *Krebs-Ringers* dan medium yang digunakan untuk kultur pada embrio mencit. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) medium dasar yang dapat dipakai dalam maturasi sel telur, fertilisasi dan pemupukan zigot atau embrio diantaranya adalah modifikasi dari larutan *Krebs-Ringers Bicarbonat* dengan suplemen piruvat, laktat dan glukosa.

Untuk menjaga pH dari medium M16 penyimpanannya harus di dalam inkubator CO₂ 5 % dengan suhu 5⁰ C. Menurut Whittingham (1971) yang dikutip oleh Bradley (1987) pemilihan medium kultur tergantung dari fase embrio yang akan dikultur. Fase pembelahan tidak memiliki metabolisme glukosa dasar, untuk itu dikultur pada media bikarbonat bufer sederhana yang ditambah asam piruvat sebagai sumber karbon. Medium pilihan yang direkomendasikan oleh Bradley (1987) adalah medium M16. *Bovine Serum Albumine* (BSA) 4 mg/ml ditambahkan ke dalam medium, yang merupakan cairan biologis yang dapat menunjang pertumbuhan sel diluar tubuh (Malole, 1990). Setelah itu dengan filtrasi dilewatkan pada filter nitroseluler 0,2 µm. Medium M16 tanpa BSA dapat disimpan pada suhu 4⁰ C bertahan sampai tiga minggu. Osmolaritas medium M16 berkisar pada 288-292 mOsm (Nagy and Rossant, 2001).

2.2. Tinjauan Tentang Medium *Human Tubal Fluid* (HTF)

Medium *Human Tubal Fluid* (HTF) merupakan medium untuk fertilisasi dan kultur *in vitro* pada manusia yang berasal dari modifikasi cairan tuba manusia. Medium ini pertama kali ditemukan oleh Dr. Patrick Quinn yaitu seorang warga negara Australia yang bertempat tinggal di Los Angeles pada tahun 1984 (Jansen, 1987). Medium HTF merupakan medium dasar untuk kultur embrio manusia dengan komposisi dasarnya terdiri dari oleh larutan *Krebs-Ringers*, mengandung ion-ion esensial untuk proses kehidupan sel yaitu Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^+ , PO_4^{3-} dan Cl^- yang terdapat dalam bufer bikarbonat dalam keadaan isotonis (Rijnders, 1996). Medium HTF harus disimpan di dalam botol tertutup pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$, dalam kondisi aseptik dapat bertahan sampai tiga puluh hari (A Cooper Surgical Company, 2003).

2.3. Superovulasi

Superovulasi adalah bertambahnya jumlah ovulasi dalam satu periode birahi yang normal dengan menggertak seekor hewan betina memakai preparat hormon (Hardjopranto, 1995). Superovulasi dapat dilakukan dengan menyuntikkan hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) atau kombinasi PMSG dan *Human Chorionic Gonadotrophin* (hCG) pada hewan betina yang telah mencapai dewasa kelamin. Respon terjadinya superovulasi tergantung pada dosis dan waktu penyuntikan yang tepat kedua hormon tersebut.

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) beberapa puluh tahun yang lalu telah ditemukan bahwa aplikasi hormon dengan aktivitas seperti *Follicle*

Stimulating Hormon (FSH) akan menstimulir pertumbuhan dan pematangan beberapa folikel pada ovarium, sehingga dapat terjadi ovulasi dalam jumlah besar. Preparat hormon yang mempunyai aktifitas sama seperti FSH adalah hormon PMSG dan preparat hormon yang mempunyai aktifitas sama dengan *Luteinizing Hormon* (LH) adalah hormon hCG.

PMSG adalah hormon yang dihasilkan oleh kuda betina yang sedang bunting dan dihasilkan dari dalam endometrium (Mahaputra, 2001). Menurut Hafez (1993) hormon tersebut dibentuk pada jaringan endometrium yang berupa mangkok-mangkok kecil dan terdapat pada aliran darah segera setelah mangkok-mangkok itu terbentuk. Dalam serum darah kuda bunting, hormon ini ditemukan pada umur kebuntingan 40 hari dan tetap tinggi kadarnya sampai hari ke-120 kemudian menurun dan menghilang setelah hari ke-180 masa kebuntingan (Partodihardjo, 1992). PMSG mempunyai komposisi kimia dari glikoprotein dan mempunyai fungsi biologis sama seperti FSH dan sedikit LH (Hafez, 2000). PMSG dengan dosis yang terlalu tinggi pada golongan mamalia dapat menyebabkan terjadinya rangsangan terhadap ovarium yang berlebihan sehingga dapat mengganggu proses ovulasi dan menurunkan kualitas sel telur yang dihasilkan (Hafez, 1993). Menurut Partodihardjo (1992) bahwa dosis untuk uji biologis pada mencit yang responnya dapat diamati adalah 2-10 IU.

hCG adalah hormon yang dihasilkan oleh wanita hamil muda dan dihasilkan oleh plasenta. Bagian plasenta yang menghasilkan hCG yaitu vili-vili dari korion induk. hCG selanjutnya dilepaskan kedalam peredaran darah induk dan peredaran darah plasenta, yang kemudian juga beredar dalam darah fetus

(Partodihardjo, 1992). hCG mempunyai komposisi kimia dari glikoprotein dan mempunyai fungsi biologis sama seperti LH (Hafez, 2000). Sifat luteotropik yang dimiliki hCG dalam tubuh wanita hamil akan merangsang korpus luteum yang baru terbentuk dari hasil ovulasi. Korpus luteum tersebut akan memproduksi progesteron yang berfungsi memelihara kehamilan (Hafez, 1993). Menurut McDonald (1975) hCG adalah hormon gonadotropin yang mempunyai pengaruh fisiologik yang sama seperti LH sehingga dapat menyebabkan perkembangan dan pematangan sel granulosa dan sel teka dari folikel masak untuk memproduksi hormon estrogen.

2.4. Sel Telur

Sel telur dihasilkan oleh ovarium melalui proses oogenesis. Dua komponen penting yang terdapat pada ovarium yaitu folikel dan korpus luteum, dalam perkembangan sel telur yang sesungguhnya berada di dalam folikel. Folikel-folikel yang terbentuk sebelum sel telur diovulasikan antara lain folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier dan folikel *de Graaf*.

Pada prinsipnya oogenesis terbagi atas tiga tahap yaitu tahap proliferasi, pertumbuhan dan menjadi masak (Ismudiono, 1999). Pada masa embrional sel kecambah primitif pembentukan gamet berkembang dan berdiferensiasi menjadi oogonia. Oogonia kemudian akan berproliferasi secara mitosis sesudah diferensiasi kelamin dan memasuki profase dari pembelahan meiosis yang pertama dimana sel-sel tersebut dinamakan oosit (Toelihere, 1985). Menurut Hafez (1993) tahap pertumbuhan terjadi secara periodik setelah hewan betina

mencapai dewasa kelamin dan sesudahnya kecuali saat bunting. Sel telur selanjutnya tumbuh secara penuh yang ditandai : pada sitoplasmanya bertambah dengan kuning telur, *zona pelucida* berkembang dan terjadi pertumbuhan yang pesat dari sel-sel folikel yang mengelilingi oosit. Pada akhir tahap ini terbentuk oosit primer di dalam folikel disusul dengan pembentukan rongga folikel (Hardjopranto, 1995). Tahap pematangan terjadi pada saat memasuki proestrus sampai estrus. Terjadi perkembangan oosit primer menjadi oosit sekunder dan sel telur akan memasuki tahap pematangan (Hafez, 1993).

Sel telur yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* harus memenuhi persyaratan sel telur yang memiliki kualitas baik. Sel telur yang memiliki kualitas baik yaitu sel telur yang sudah mengalami proses pematangan inti dan sitoplasma. Metode utama penilaian sel telur adalah melalui evaluasi visual atau penilaian morfologis. Secara mikroskopis pematangan inti ditandai inti yang tampak mengalami metafase II dan sitoplasma akan tampak sel-sel granulosa yang longgar dan berwarna terang. Menurut Laufer *et al* (1984) yang dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992), penilaian morfologi kompleks sel telur korona radiata-kumulus ooforus yang diisolasi dari folikel antral dapat dibagi menjadi :

a. Sel telur yang belum matang (*immature oocytes*) terdiri atas tiga fase :

Fase 1 : kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak oosit tidak jelas.

Fase 2 : kompleks dengan kumulus ooforus sedikit, korona radiata tampak dan sel telur tidak jelas.

Fase 3 : kompleks dengan kumulus ooforus sedikit, korona radiata kompak dan sel telur tampak samar-samar.

- b. Sel telur matang (*mature oocytes*) terbagi atas dua fase yang merupakan kelanjutan dari proses pematangan :

Fase 4 : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar (*expanded cumulus*), sedikit berlendir (*mucinifikasi*).

Fase 5 : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar (*expanded cumulus*), cukup berlendir, sel telur nampak jelas dan memiliki badan kutub I (metafase II).

- c. *Post immature oocytes*

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

- d. *Degenerated oocytes*

Korona radiata bervariasi, kumulus lepas atau sama sekali tanpa kumulus dan sel telur mengalami degenerasi atau piknotis.

2.5. Spermatozoa

Spermatozoa dihasilkan oleh testis melalui proses spermatogenesis. Menurut Hardjopranjoto (1995) spermatogenesis pada hewan mamalia dibagi menjadi empat tahap yaitu :

1. Tahap proliferasi, tahap ini dimulai pada testis hewan sejak sebelum lahir sampai beberapa waktu setelah lahir. Bakal sel kelamin yang ada pada lapisan

basal dari tubulus seminiferus melepaskan diri dan membelah secara mitosis sampai dihasilkan banyak sel spermatogonia.

2. Tahap tumbuh, pada tahap ini spermatogonia membagi diri secara mitosis sebanyak empat kali sehingga dihasilkan spermatosit primer.
3. Tahap menjadi masak, pada tahap ini terjadi pembelahan meiosis sehingga sel spermatosit primer berubah menjadi spermatosit sekunder dan jumlah kromosom menjadi separuhnya. Beberapa jam kemudian spermatosit sekunder akan berkembang menjadi spermatid.
4. Tahap transformasi, pada tahap ini terjadi proses metamorfose seluler dari sel spermatid sehingga terbentuk sel spermatozoa.

Spermatozoa terdiri dari bagian kepala, bagian tengah dan ekor. Suatu nukleus yang terentang kira-kira sepertiga panjang kepala mengandung bahan genetik yang dibutuhkan untuk pembuahan sel telur (Frandsen, 1992). Menurut Bearden dan Fuquay (1992) komponen penting dari kepala spermatozoa adalah nukleus yang mengandung kode genetik, *post nuclearcap* yang menutup bagian posterior nukleus dan akrosom yang menutup bagian anterior nukleus serta mengandung enzim yang dibutuhkan untuk penetrasi korona radiata dan *zona pellucida* pada proses fertilisasi. Bagian tengah digambarkan sebagai pusat tenaga spermatozoa karena mitokondria berada terpusat pada daerah ini. Mitokondria menghasilkan enzim yang menggerakkan siklus *Krebs* dan transport elektron serta fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphospat* (ATP) untuk gerakan spermatozoa (Frandsen, 1992). Ekor

spermatozoa mempunyai *flagellum* yang mempunyai fibril-fibril. Fibril-fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa.

Spermatozoa yang diambil secara eksperimental mempunyai kemampuan membuahi sel telur, tetapi umumnya kemampuan fertilisasi tersebut memerlukan pemasakan. Kapasitasi terjadi pada waktu spermatozoa berjalan melalui epididimis dimana terdapat pengurangan kadar air dan terjadi perubahan konsentrasi ion dalam spermatozoa (Frandsen, 1992). Kapasitasi selanjutnya terjadi dalam saluran reproduksi betina. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) perubahan-perubahan yang terjadi pada spermatozoa ketika melintas melalui saluran reproduksi betina adalah penurunan konsentrasi kolesterol pada permukaan spermatozoa, perubahan glikosaminogen dan perubahan ion-ion. Kapasitasi akan mengaktifkan akrosom sehingga terjadi reaksi akrosom. Reaksi akrosom meliputi pelepasan membran plasma spermatozoa dan membran luar akrosom. Perubahan reaksi akrosom diperlukan spermatozoa untuk dapat menembus sel telur. Kapasitasi berperan mencegah aktivasi dini dari akrosom sampai spermatozoa mencapai tempat fertilisasi dan kontak dengan sel telur. Spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi akan mempunyai potensi untuk membuahi sel telur.

2.6. Teknik *Flushing* Sel Telur Mencit

Sel telur yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dipanen (*diflusing*) dari kantung fertilisasi pada tuba falopii 17 jam setelah penyuntikan hCG pada saat superovulasi. Sel telur yang dikoleksi diharapkan sudah mengalami pematangan inti dan sitoplasma sehingga sel telur mampu menyempurnakan fertilisasi dan

dapat berkembang normal menjadi embrio (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Penanganan dan pelaksanaan *flushing* sel telur dilakukan dengan hati-hati dan teliti. Korona radiata dan kumulus ooforus sebaiknya tidak dirusak atau dilepas dari sel telur. *Flushing* sel telur mencit harus dilakukan tepat waktu yaitu 17 jam setelah penyuntikan hCG pada saat superovulasi. Jika lebih dari waktu yang ditetapkan maka akan diperoleh sel telur yang *over matured* dengan ditandai oleh *cumulus oophorus expansion*, sehingga kumulus ooforus sulit ditembus oleh spermatozoa dan akan mengganggu proses fertilisasi (Fukui, 1990).

2.7. Fertilisasi

Fertilisasi adalah peristiwa bersatunya spermatozoa dan sel telur untuk membentuk zigot. Secara *in vivo* terjadi di bagian ampulla dari tuba falopii (Toelihere, 1985). Pada fertilisasi meliputi perubahan dalam sifat aktifitas renang dan modifikasi susunan membran kepala spermatozoa (Hunter, 1995).

Spermatozoa mengalami serangkaian proses yang dimulai dari penembusan pada sel – sel korona radiata, lapisan protein atau *zona pellucida* dan membran *vitelline*. Proses fertilisasi yang sebenarnya dimulai dari bertemunya kepala spermatozoa dengan *zona pellucida* sampai dengan bersatunya inti sel dari spermatozoa dan sel telur (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa sebelum sampai di tempat fertilisasi harus mengalami proses kapitasi terlebih dahulu (Hogan *et al.*, 1986). Spermatozoa untuk dapat menembus sel telur pertama harus melewati sel–sel kumulus dengan gerakan peristaltik spermatozoa sendiri dan dibantu oleh *Corona Penetrating Enzyme* / CPE (Bearden and Fuquay, 1992) dan enzim

hyaluronidase yang berfungsi melarutkan asam hyaluronat yang dikeluarkan oleh kumulus ooforus. Enzim ini mempunyai berat molekul tinggi dan mempunyai kemampuan untuk mendepolarisasi asam hyalu-protein yaitu bahan perekat yang menyatukan sel-sel kumulus satu sama lain. Menurut Partodihardjo (1992) enzim hyaluronidase memegang peranan yang sangat penting dalam proses fertilisasi.

Jika sel telur telah dibebaskan dari sel kumulus, tahap selanjutnya adalah spermatozoa harus menembus *zona pellucida* dan membran *vitelline* melalui reaksi akrosom yaitu perubahan yang terjadi pada kepala spermatozoa pada saat bertemu dengan sel telur dimana isi akrosom dipancarkan segera setelah kepala spermatozoa mencapai *zona pellucida*. *Zona pellucida* mempunyai reseptor spesifik terhadap spermatozoa, reseptor ini akan berubah setelah spermatozoa pertama menembus sehingga tidak akan dikenali oleh spermatozoa lain. Reaksi ini disebut reaksi zona yaitu reaksi pertahanan pertama terhadap polispermia (Sukra dkk., 1989; Tomaszewska *et al.*, 1991).

Spermatozoa setelah menembus *zona pellucida* akan menembus membran *vitelline* dan terjadi peleburan antara membran plasma dengan spermatozoa. Penembusan spermatozoa pada membran *vitelline* ini terjadi reaksi kortek yaitu reaksi pertahanan kedua terhadap polispermia. Butir-butir kortek yang terletak di bawah membran *vitelline* akan lepas dan membentuk ruang *perivitelline*. Ruangan ini makin lama makin luas dan permulaan perluasannya dimulai dari tempat spermatozoa masuk (Sukra dkk., 1989). Kepala spermatozoa kemudian mengalami kondensasi (Hogan *et al.*, 1986) dan ekornya terlepas, intinya berubah menjadi pronukleus jantan. Pronukleus jantan kemudian bergabung dengan

pronukleus betina, dimana pronukleus betina berasal dari sel telur yang mengalami pembelahan meiosis kedua dan akan melepaskan benda kutub kedua. Kedua pronukleus tersebut akan mengalami fusi gamet dan membentuk zigot.

2.8. Fertilisasi *In Vitro*

Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan manusia dengan memanfaatkan sel telur dan spermatozoa di luar tubuh. Penggunaan fertilisasi *in vitro* sebagai salah satu upaya untuk mengatasi masalah infertilitas telah banyak dikembangkan. Penelitian tentang fertilisasi *in vitro* diawali pada tahun 1878 dan merupakan laporan pertama tentang fertilisasi *in vitro* yang telah berhasil dilakukan (Bavister, 2002).

Dalam bidang kedokteran manusia, teknik fertilisasi *in vitro* telah digunakan untuk mengatasi masalah kemandulan akibat adanya sumbatan pada tuba falopii yang dilakukan oleh Steptoe dan Edward tahun 1967 di Inggris (Tomaszweska *et al.*, 1991) yang melahirkan bayi perempuan bernama *Louise Brown*. Dalam bidang kedokteran hewan, fertilisasi *in vitro* ini dipadukan dengan teknik transfer embrio yaitu *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET). Teknik ini telah diaplikasikan secara luas di Eropa, Jepang, Amerika dan Australia dalam dua dasawarsa terakhir untuk menghasilkan anak (embrio) yang banyak dalam satu kali siklus reproduksi (Nalley, 2001).

Tersedianya embrio yang berkualitas dalam jumlah yang banyak dengan umur (stadium perkembangan) yang seragam merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan transfer embrio dan pengembangan penelitian di bidang

bioteknologi reproduksi (Monk, 1987). Menurut First dan Parrish (1987), fertilisasi *in vitro* membutuhkan :

1. Sistem pematangan sel telur yang efisien dan tidak merusak sel telur.
2. Pematangan inti, sitoplasma dan sel – sel kumulus dari sel telur.
3. Sistem biakan kultur yang tidak merusak.
4. Sistem kapasitasi spermatozoa
5. Sistem dan kondisi yang efisien untuk melakukan fertilisasi.

Fertilisasi *in vitro* merupakan sarana analisis berharga untuk meneliti faktor biokimia dan fisiologis yang ikut berperan dalam keberhasilan penggabungan gamet (Hunter, 1995).

2.9. Medium Kultur *In Vitro*

Penggunaan medium kultur sebenarnya tergantung dari tujuan untuk kultur serta materi yang akan dikultur, oleh karena itu ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan yaitu jenis sel yang akan digunakan, dipakai untuk menumbuhkan sel atau untuk mempertahankan kehidupan sel yang sudah jenuh pertumbuhannya, untuk populasi sel yang homogen atau heterogen, untuk diferensiasi atau proliferasi (Malole, 1990).

Kultur sel gamet relatif lebih homogen dibandingkan kultur jaringan atau organ, sedangkan jaringan embrio sampai fase blastosis relatif lebih homogen, asalkan dipenuhi kebutuhan dasar lainnya untuk kultur (Hafez, 1993). Kultur embrio harus mampu menopang daya tahan hidup dan perkembangan embrio untuk berkembang lebih baik karena embrio merupakan sel – sel muda yang aktif

berbiak. Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tersebut di atas maka perlu dipertimbangkan sifat-sifat kimia dan fisik yang mempengaruhi medium kultur sehingga meningkatkan keberhasilan kultur *in vitro* (Malole, 1990).

Pada kultur jaringan ada dua jenis medium yang digunakan yaitu medium biologis dan medium kultur buatan. Menurut Malole (1990) pada dasarnya bila sel diambil dari jaringan atau organ asalnya dan dibuat kultur maka medium penumbuhnya harus menyediakan semua kondisi lingkungan yang sama dengan keadaan yang dialami sel dalam lingkungan *in vivo*. Sehingga medium kultur embrio harus dibuat menyerupai cairan dalam saluran reproduksi betina. Medium kimia yang pertama kali dipakai untuk kultur embrio yang sedang membelah dibuat oleh Whitten (1956) dan diperoleh blastosis mencit dari tahap awal kultur 8 sel. Komposisi medium ini didasarkan pada larutan *Krebs-Ringers* bikarbonat dan disuplementasi dengan glukosa, *bovine serum albumine*, dan antibiotik. Medium kimia yang ditambahkan produk asal biologis seperti ini disebut medium kimia semi buatan (*chemically semi-defined medium*). Medium kultur buatan disusun dengan cara mencampurkan berbagai bahan kimia organik menjadi satu larutan yang memenuhi kebutuhan sel. Dalam penyusunan medium kultur buatan yang harus diperhatikan adalah sifat kelarutan bahan kimia yang digunakan, kemurniannya, kestabilan kandungan ion-ionnya dari bahan yang dipakai, cara penanganan yang tidak sempurna mungkin akan menyebabkan kegagalan kultur embrio (Malole, 1990).

Medium juga menyediakan ion-ion seperti Ca^{2+} , Mg^+ , K^+ , dan PO_4 . Jumlah dan komposisi zat-zat dalam medium tersebut dibuat mendekati nutrisi, elektrolit, dan makromolekul yang ada dalam cairan saluran reproduksi betina. Sifat-sifat fisik yang perlu diperhatikan pada medium buatan adalah pH, osmolaritas, suhu, kekentalan (viskositas), tegangan permukaan dan bufer (Malole, 1990). Tingkat pH dalam medium fertilisasi *in vitro* biasanya berkisar pada pH 7,4. Walaupun fertilisasi juga dapat terjadi pada tingkat pH sampai 8,0 tetapi embrio awal tidak dapat berkembang baik pada tingkat pH tersebut. pH 7,4 dipilih karena sama dengan pH darah serta memberikan tingkat keasaman yang baik untuk fertilisasi dan perkembangan awal (Rijnders, 1996). Walaupun pH yang optimum untuk pertumbuhan memiliki variasi yang kecil diantara beberapa jenis sel (Freshney, 1987).

Sebagian besar kultur sel memiliki toleransi yang besar terhadap perubahan osmolaritas / tekanan osmose. Tekanan osmose dapat ditoleransi oleh sebagian sel berkisar antara 260 – 320 mOsmol/kg (Freshney, 1987). Pada embrio mencit tahap satu sel osmolaritas yang dibutuhkan berkisar antara 250 – 280 mOsmol (Brinster, 1965).

Suhu mempengaruhi pH melalui peningkatan kelarutan tekanan CO_2 pada suhu rendah dan mungkin melalui perubahan ionisasi pH dari bufer (Malole, 1990), selain itu suhu juga memberikan pengaruh langsung terhadap pertumbuhan sel. Suhu dalam kultur diatur menyerupai tempat dimana sel atau organ berasal dan pada sel mamalia umumnya suhu tubuhnya adalah 37°C . Sistem bufer yang biasanya digunakan dalam kultur sel adalah bufer bikarbonat dengan penambahan karbondioksida 5 % pada ruangan di atas medium karena sistem ini sesuai dengan

sistem fisiologis dalam darah (Rijnders, 1996). Lebih lanjut Freshney (1987) menyatakan bahwa keseimbangan tekanan CO₂ di dalam dan di luar media dapat dipertahankan dengan pemberian 5 % CO₂. Sejalan dengan pendapat Malole (1990) yang menyatakan bahwa bila diinginkan terjadi keseimbangan pH pengaturannya dapat dilakukan dengan penambahan CO₂ 5 %.

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Jurusan Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang dimulai pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2003.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Materi Penelitian

Materi penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan percobaan dan medium kultur buatan. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina, jantan vasektomi, dan jantan normal yang berumur tiga bulan dengan strain BALB-C.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah medium M16, medium *Human Tubal Fluid* (HTF), *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma), *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) (Intervet), *Human Chorionic Gonadotrophin* (hCG)(Intervet), antibiotika Gentamicine Sulfate, minyak mineral (Sigma), dan *deionise water*.

3.2.3. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator CO₂ 5 %, *laminar air flow*, mikroskop *inverted*, mikropipet otomatis

(Eppendorf), gunting mikro, pinset mikro, *scalpel*, pipet *Pasteur* (German), membran millipore 0,45 μ m (Whatman), bunsen, neraca analitik, spuit (1cc, 5 cc, 10 cc)(Terumo), cawan petri (Falcon), beker gelas, aluminium foil, tissue dan lain-lain.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Vasektomi

Vasektomi pada mencit jantan dilakukan pada mencit jantan yang berumur kira-kira enam minggu. Tahap-tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Melakukan anestesi pada mencit jantan dengan menggunakan Ketamin dengan dosis 0,5 ml/25 gr BB secara intraperitoneal. Ketamin akan bekerja kira – kira 10 menit setelah penyuntikan. Dilanjutkan dengan mengikat dan merentangkan kedua kaki depan dan belakang pada papan dengan posisi rebah dorsal.
2. Lokasi pembedahan yaitu testis disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70 %.
3. Dilakukan pembedahan pada testis yaitu di bagian kulit yang menghubungkan kedua testis dengan menggunakan *scalpel*.

4. Setelah testis dikeluarkan, mencari bagian epididimis sampai vas deferens, kemudian ikat dengan menggunakan *cat gut*. Sebelum dijahut kembali, semprotkan terlebih dahulu antibiotika lokal pada daerah tersebut. Selanjutnya jahit kembali bagian kulit yang telah dibedah dengan menggunakan *cat gut*.

3.3.2. Persiapan Medium

Medium M16 dan medium HTF dibuat sesuai prosedur pembuatan kedua medium. Sebelum digunakan untuk fertilisasi *in vitro*, dibuat terlebih dahulu medium tetes dalam cawan petri dengan volume 50 mikroliter sebagai medium pencuci dan 25 mikroliter sebagai medium kultur *in vitro*. Medium tetes kemudian diinkubasi selama tiga jam di dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 ° C sebelum digunakan untuk fertilisasi *in vitro*.

3.3.3. Koleksi Sel Telur

Koleksi sel telur dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut :

1. Melakukan superovulasi dengan menggunakan hormon PMSG dan hCG yaitu mencit betina disuntik secara intraperitoneal dengan PMSG 5 IU, 48 jam kemudian disuntik secara intraperitoneal hormon hCG 5 IU dan mencit langsung dicampur dengan mencit jantan vasektomi secara monomating untuk menggerak ovulasi.
2. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina untuk mengetahui betina yang positif kawin dan dilakukan *flushing* sel telur.

3. Mencit betina dibunuh dengan cara dislokasio leher kemudian uterus dipreparir dan tuba falopii diangkat, setelah itu dilakukan pembilasan dengan menggunakan medium M16.
4. Selanjutnya tuba falopii diletakkan di cawan petri untuk dilakukan *flushing* sel telur di bawah mikroskop *inverted*.

3.3.4. *Flushing* Sel Telur

Menurut Monk (1987) *flushing* sel telur mencit dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Mencit betina dibunuh dengan cara dislokasio leher, kemudian mengeluarkan tuba falopii dan meletakkannya pada cawan petri yang telah berisi medium M16+Bovine Serum Albumine (BSA). Sebelum digunakan medium tersebut dihangatkan terlebih dahulu dalam inkubator pada suhu 37 ° C. Kemudian memanipulasi tuba falopii yang diperoleh dengan cara merobek tuba falopii untuk mengeluarkan kantung fertilisasi. Semua proses tersebut dilakukan di bawah mikroskop *inverted*. Jika ovulasi telah terjadi lebih dari 10 jam massa sel kumulus yang mengelilingi sel telur akan tampak jelas pada kantung fertilisasi.
2. Dilanjutkan dengan melepaskan massa kumulus dalam medium M16+BSA dengan cara menyobek dinding kantung fertilisasi dengan menggunakan *forceps watchmaker's* atau kanula.

3. Memindahkan medium sebanyak mungkin tanpa memindahkan sel telur. Alat yang digunakan pada proses ini adalah pipet *Pasteur* yang telah dimodifikasi pada ujungnya dan pada ujung yang lainnya berhubungan dengan selang plastik serta mulut untuk menghisap medium.
4. Setelah sel telur tampak pada dasar cawan petri, tambahkan kembali medium M16+BSA secukupnya. Koleksi sel telur dengan pipet *Pasteur* modifikasi dan cuci sel telur yang diperoleh dengan menggunakan medium M16+BSA. Proses pencucian ini dilakukan dengan cara menghisap medium M16+BSA dengan pipet *Pasteur* modifikasi dan tambahkan kembali dengan medium M16+BSA yang baru. Dilakukan beberapa kali sampai sel telur terbebas dari sel-sel kumulus.
5. Selanjutnya memindahkan sel telur pada cawan petri yang telah berisi medium M16+BSA yang baru untuk diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37⁰ C selama satu jam.

3.3.5. Koleksi Spermatozoa

Koleksi spermatozoa dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut :

1. Mencit jantan normal dibunuh dengan cara dislokasio leher dan diambil bagian kauda epididimisnya. Kauda epididimis yang diperoleh dicuci dengan menggunakan medium M16.

2. Selanjutnya kauda epididimis diletakkan di dalam cawan petri yang sudah ditambahkan 1 ml medium M16. Untuk membebaskan spermatozoa kauda epididimis digunting kecil-kecil, kemudian inkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37⁰ C selama satu jam.

3.3.6. Fertilisasi dan Kultur *In Vitro*

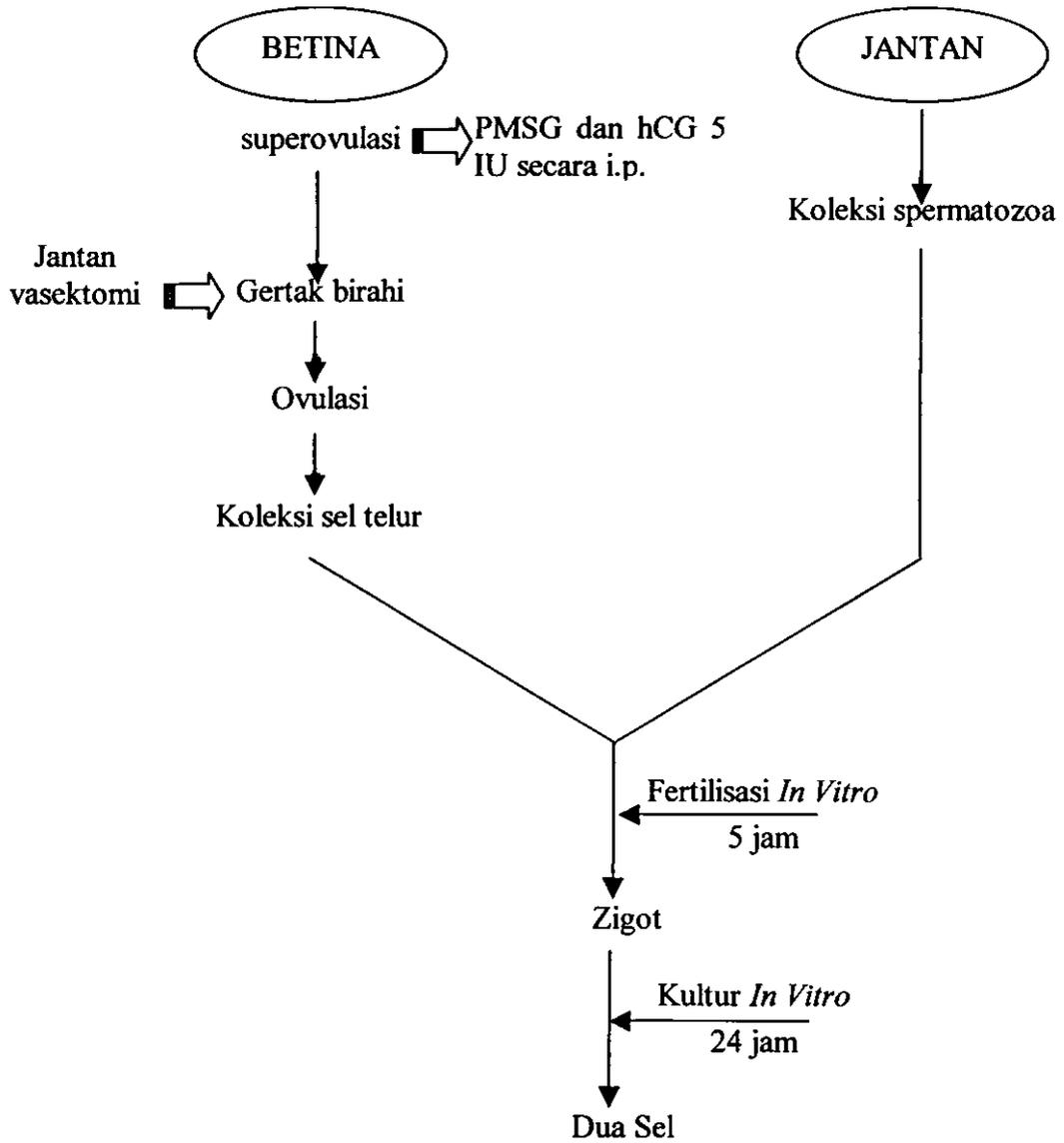
1. Sel telur dan spermatozoa yang telah diinkubasi dipindahkan pada masing-masing medium kultur yaitu medium M16 dan medium HTF dengan menggunakan pipet *Pasteur* modifikasi. Inkubasi kembali di dalam inkubator CO₂ 5 % selama lima jam untuk melakukan fertilisasi *in vitro*.
2. Setelah lima jam, periksa sel telur yang telah difertilisasi dan pindahkan ke dalam medium kultur baru untuk kultur *in vitro*. Inkubasi kembali ke dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37⁰ C dan diperiksa setiap 24 jam kemudian untuk mengetahui perkembangannya.

3.4. Pengamatan

1. Pengamatan pada angka fertilisasi dilakukan setelah lima jam diinkubasi dengan menghitung jumlah zigot yang terbentuk pada saat fertilisasi *in vitro* dalam masing-masing medium kultur.
2. Pengamatan perkembangan embrio mencit tahap dua sel berdasarkan jumlah zigot yang dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel dan yang mengalami degenerasi pada masing-masing medium kultur. Pengamatannya dilakukan 24 jam kemudian.

3.5. Analisa Data

Data yang diperoleh terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio mencit tahap dua sel dianalisis dengan Uji t (Sudjana, 1996). Data tersebut dianalisis menurut *Statistical Product and Services Solution (SPSS) incorp* (Singgih, 2001).



Gambar 1. Rancangan Penelitian



Gambar 2. Testis dan Kauda Epididimis Mencit: Testis (A), Kauda Epididimis (B).



Gambar 3. Uterus dan Tuba Falopii Mencit: Uterus (A), Tuba Falopii (B).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Angka Fertilisasi

Hasil yang didapat dari pengamatan pada sel telur mencit yang difertilisasi secara *in vitro* pada medium kultur M16 dan *Human Tubal Fluid* (HTF) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Data Hasil Pengamatan Sel Telur Yang Difertilisasi Pada Medium HTF dan Medium M16

Perlakuan	Jumlah Sel Telur	Pengamatan	
		Fertilisasi	Tidak Terfertilisasi
HTF	14	14	-
	11	11	-
	7	7	-
	39	38	1
	36	36	-
	42	42	-
Total	149	148	1
M16	16	16	-
	10	10	-
	11	11	-
	35	31	4
	32	32	-
	36	36	-
Total	140	136	4

Data yang diperoleh distribusinya tidak normal, maka data yang diperoleh perlu ditransformasikan ke dalam bentuk $\text{Arcsin}\sqrt{y} \%$ sebelum dianalisis dengan Uji t. Hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SD.

Dari hasil analisis dengan menggunakan Uji t terhadap angka fertilisasi sel telur mencit yang difertilisasi secara *in vitro* pada kedua medium kultur

menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata ($p>0,05$). Analisis statistiknya dapat dilihat pada lampiran 1.

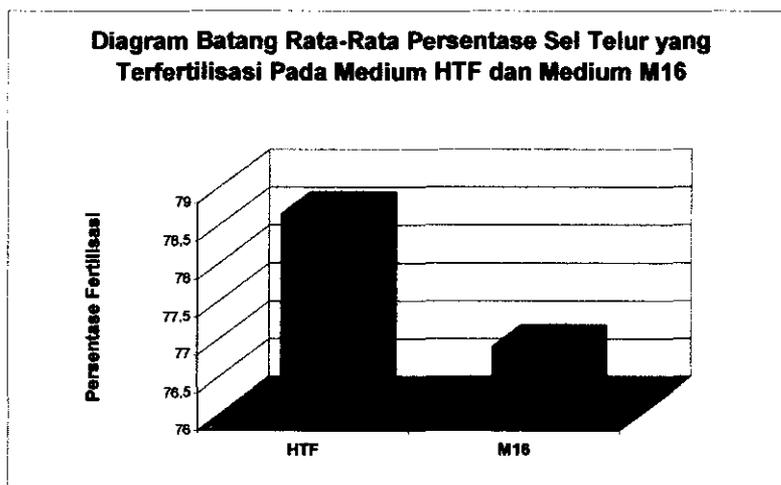
Rata-rata persentase sel telur yang terfertilisasi pada medium M16 sebesar $76,89 \pm 3,25 \%$ dan pada medium HTF sebesar $78,64 \pm 1,04 \%$.

Tabel 2. Rata-Rata Persentase Sel Telur Yang Terfertilisasi Pada Medium M16 dan Medium HTF

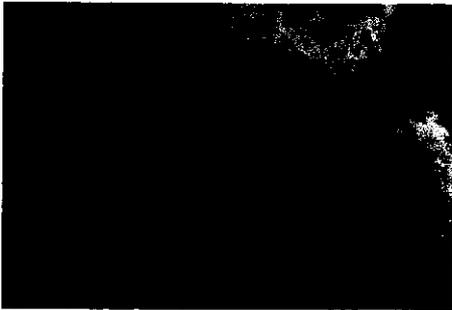
Perlakuan	Jumlah Sel Telur	Fertilisasi		
		Jumlah sel telur terfertilisasi	Persentase Fertilisasi	ArcSin $\sqrt{y}\%$
M16 (n=6)	140	136	$98,09 \pm 4,66$	$76,89 \pm 3,25^a$
HTF (n=6)	149	148	$99,57 \pm 1,04$	$78,64 \pm 1,04^a$

Ket : n = jumlah ulangan

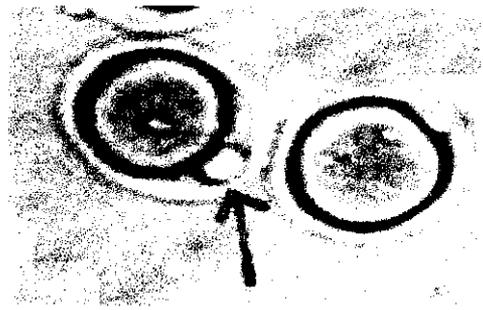
Tanda superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$).



Gambar 4. Diagram Batang Persentase Sel Telur Yang Terfertilisasi pada Medium HTF dan Medium M16



Gambar 5. Sel Telur Mencit



Gambar 6. Sel Telur Mencit Yang Mengalami Proses Fertilisasi dan Terdapat Bentuk Polar Body II



Gambar 7. Kantong Fertilisasi Pada Tuba Falopii Mencit

4.2 Perkembangan Embrio Tahap Dua Sel

Hasil yang didapat dari pengamatan perkembangan embrio mencit tahap dua sel berdasarkan adanya embrio yang dapat berkembang menjadi tahap dua sel pada kedua medium kultur dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Pengamatan Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Pada Medium HTF dan M16

Perlakuan	Jumlah Sel Telur	Zigot	Pengamatan Embrio Tahap Dua Sel	
			Berkembang	Degenerasi
HTF	14	14	6	8
	11	11	8	3
	7	7	7	-
	39	38	33	5
	36	36	36	-
	42	42	42	-
Total	149	148	132	16
M16	16	16	12	4
	10	10	10	-
	11	11	9	2
	35	31	21	10
	32	32	30	2
	36	36	36	-
Total	140	136	118	18

Data yang diperoleh distribusinya tidak normal, maka data perlu ditransformasikan ke dalam bentuk $Arc \sin \sqrt{y} \%$ sebelum dianalisis dengan Uji t. Hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SD.

Berdasarkan analisis dengan menggunakan Uji t terhadap perkembangan embrio tahap dua sel yang dikultur pada medium M16 dan HTF tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hasil analisis statistiknya dapat dilihat pada lampiran 2.

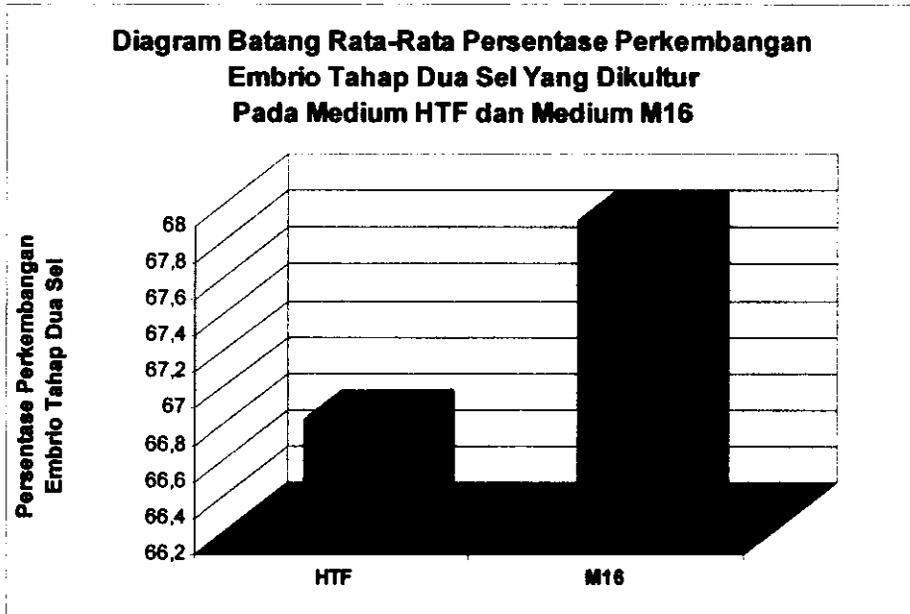
Rata-rata persentase perkembangan embrio tahap dua sel yang dikultur pada medium M16 sebesar $67,91 \pm 11,28 \%$ dan pada medium HTF sebesar $66,82 \pm 15,04 \%$.

Tabel 4. Rata-Rata Persentase Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Yang Dikultur Pada Medium M16 dan HTF

Perlakuan	Jumlah Sel Telur	Jumlah Zigot	Perkembangan Embrio Tahap Dua Sel		
			Jumlah embrio tahap 2 sel	Persentase Perkembangan	ArcSin $\sqrt{y}\%$
M16 (n=6)	140	136	118	85,09±15,88	67,91±11,28 ^a
HTF (n=6)	149	148	132	83,36±22,74	66,82±15,04 ^a

Ket : n = jumlah ulangan

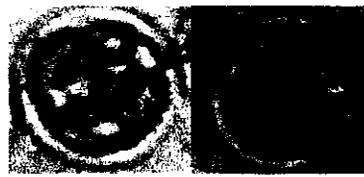
Tanda superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$).



Gambar 8. Diagram Batang Rata-Rata Persentase Perkembangan Embrio Tahap Dua Sel Yang Dikultur Pada Medium HTF dan Medium M16



Gambar 12. Morfologi Embrio Yang Dapat Berkembang Menjadi Tahap Dua Sel



Gambar 13. Morfologi Embrio Yang Mengalami Degenerasi

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Angka Fertilisasi

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa angka fertilisasi yang diperoleh terhadap sel telur yang difertilisasi secara *in vitro* pada medium M16 76,89 % dan pada medium HTF 78,64 %. Dengan analisis statistik Uji t hasil yang diperoleh terhadap angka fertilisasi pada kedua medium tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Namun pada pengamatan yang dilakukan juga terdapat sel telur yang tidak mengalami fertilisasi baik pada medium M16 maupun medium HTF. Sel telur yang telah mengalami fertilisasi *in vitro* pada medium kultur akan menghasilkan zigot yang ditandai dengan terbentuknya badan kutub kedua. Menurut Sukra dkk (1993) kegagalan terjadinya fertilisasi *in vitro* dapat disebabkan oleh faktor-faktor pada maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa dan kondisi fisiologis medium kultur.

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* salah satunya tergantung dari usaha pematangan sel telur secara *in vitro*. Sel telur yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* berasal dari mencit betina yang telah disuperovulasi dengan menggunakan hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) dan hormon *Human Chorionic Gonadotrophin* (hCG). Hormon PMSG mempunyai fungsi biologis sama seperti *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) yaitu merangsang perkembangan folikel dan hCG mempunyai fungsi sama seperti *Luteinizing Hormon* (LH) yaitu

membantu perkembangan folikel hingga mencapai proses pematangan yang sempurna serta menyebabkan terjadinya ovulasi.

Pada fertilisasi *in vitro* sel telur yang dikoleksi dari kantung fertilisasi, dimana sel telur telah menjadi matang akibat pengaruh LH *surge* pada kondisi alamiah atau melalui pemberian hCG pada saat superovulasi. Sel telur yang matang adalah sel telur yang sudah mengalami proses pematangan inti dan sitoplasma. Secara mikroskopis pematangan inti ditandai dengan inti yang tampak mengalami metafase II dan sitoplasma akan tampak sel-sel granulosa dan berwarna terang. Apabila proses pematangan tidak serempak maka terdapat kemungkinan sel telur yang *over matured* dengan ditandai oleh *cumulus oophorus expansion*, sehingga kumulus ooforus sulit ditembus oleh spermatozoa dan akan mengganggu proses fertilisasi (Fukui, 1990). Selain itu dapat pula menyebabkan pelepasan badan kutub yang tidak bersamaan.

Spermatozoa yang diambil untuk fertilisasi *in vitro* berasal dari kauda epididimis pejantan normal yang dibunuh. Di dalam kauda epididimis spermatozoa sudah mengalami kapasitasi dan dilanjutkan di dalam saluran reproduksi betina. Pada penelitian ini, spermatozoa tidak mengalami kapasitasi yang terjadi di dalam saluran reproduksi betina. Secara *in vitro*, spermatozoa dapat melakukan kapasitasi di dalam media yang dilengkapi dengan cairan folikel, serum atau serum albumin. Di dalam medium kultur yang digunakan pada penelitian ini, kapasitasi spermatozoa dibantu dengan penambahan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dalam medium kultur. Penambahan albumin yang terkandung dalam BSA ini dapat mengubah pospolipid pada membran spermatozoa sehingga

reaksi akrosom dapat berlangsung. Yanagimachi (1970) menyatakan bahwa spermatozoa hamster dapat mengalami kapasitas spontan dengan distimulasi oleh BSA 2-5 mg/ml. Menurut Funahashi *et al* (1998) BSA sangat dibutuhkan untuk penetrasi spermatozoa tikus pada proses fertilisasi *in vitro*.

Pada fertilisasi *in vivo*, sel telur dan spermatozoa bertemu di tuba falopii. Kondisi lingkungan dan kandungan nutrisi dalam tuba falopii sangat mendukung terjadinya fertilisasi. Pada fertilisasi *in vitro*, sel telur dan spermatozoa dikoleksi dan difertilisasi di dalam medium kultur. Di dalam medium kultur seluruh proses, kondisi lingkungan dan komposisi zat-zat penyusun media kultur diatur menyerupai keadaan pada saat terjadinya fertilisasi *in vivo*. Keadaan tersebut diharapkan dapat mendukung terjadinya fertilisasi *in vitro* sehingga akan diperoleh zigot yang ideal dan mampu berkembang menjadi embrio tahap selanjutnya. Pada penelitian ini menggunakan medium M16 dan medium HTF sebagai medium untuk fertilisasi. Hasil yang diperoleh terhadap angka fertilisasi pada medium M16 76,89 % dan pada medium HTF 78,64 %. Angka fertilisasi pada medium HTF sedikit lebih tinggi daripada angka fertilisasi pada medium M16. Dengan Uji t hasil yang diperoleh terhadap angka fertilisasi pada kedua medium tidak berbeda nyata. Artinya kedua medium yaitu medium M16 dan medium HTF dapat mendukung terjadinya fertilisasi *in vitro* pada mencit. Hal ini dapat terjadi karena medium M16 dan medium HTF menyediakan zat-zat yang dibutuhkan oleh sel telur dan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi secara *in vitro*. Sesuai dengan pendapat Malole (1990) pada dasarnya bila sel diambil dari jaringan atau organ asalnya dan dibuat kultur maka medium penumbuhnya harus

menyediakan semua kondisi lingkungan yang sama dengan keadaan yang dialami sel dalam lingkungan *in vivo*. Dengan demikian jumlah dan komposisi zat-zat penyusun pada medium M16 dan medium HTF menyerupai jumlah dan komposisi zat-zat penyusun pada cairan dalam saluran reproduksi betina sehingga memungkinkan terjadinya fertilisasi secara *in vitro*. Kondisi lingkungan di dalam inkubator yang stabil juga dapat mendukung terjadinya fertilisasi. Suhu yang tidak stabil akan mempengaruhi pH sehingga akan mengganggu terjadinya fertilisasi. Karena medium M16 dan medium HTF yang digunakan sebagai medium untuk fertilisasi sistem bufer yang digunakan adalah bufer bikarbonat, dimana pH dan suhunya harus benar-benar dijaga. Diharapkan kondisi lingkungan medium kultur menyerupai kondisi lingkungan pada saat fertilisasi *in vivo* agar sel gamet tersebut dapat bertahan hidup, berkembang dan berdiferensiasi (Malole, 1990).

5.2. Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa zigot yang dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel pada medium M16 sebesar 67,91 % dan pada medium HTF sebesar 66,82 %. Dengan analisis statistik Uji t hasil yang diperoleh terhadap perkembangan embrio tahap dua sel pada kedua medium tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Zigot yang diperoleh dari fertilisasi *in vitro* pada medium kultur dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel namun juga terdapat zigot yang tidak dapat berkembang dan mengalami degenerasi. Artinya sel-selnya mengalami kehancuran, piknosis dan fragmentasi. Timbulnya degenerasi pada kultur embrio

mencit tahap dua sel baik pada medium M16 maupun medium HTF secara garis besar dapat disebabkan oleh dua hal.

Faktor pertama berasal dari luar artinya faktor yang berasal dari luar medium kultur, seperti penanganan medium kultur yang tidak baik dan peralatan yang tidak aseptik. Pada medium M16 dan medium HTF sistem bufer yang digunakan adalah bufer bikarbonat dimana pH medium harus dijaga. Apabila terjadi fluktuasi suhu pada inkubator maka akan terjadi perubahan suhu yang dapat mempengaruhi pH. pH berhubungan dengan suhu, apabila medium disimpan pada suhu yang terlalu rendah maka akan mempengaruhi pH melalui perubahan kelarutan CO₂ pada suhu rendah dan mungkin melalui perubahan ionisasi pH dari bufer (Malole, 1990) serta perubahan pH memberikan pengaruh langsung terhadap pertumbuhan sel. Apabila disimpan pada suhu terlalu tinggi akan menyebabkan medium rusak, diketahui beberapa unsur kimia penyusun medium kultur yang bertemu pada suhu tinggi akan membentuk senyawa yang tidak diinginkan. Secara umum dalam pelaksanaan fertilisasi *in vitro* harus dilaksanakan dalam keadaan aseptik baik peralatan maupun tempatnya. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri yang tidak diinginkan sehingga akan mengganggu proses fertilisasi dan perkembangan embrio selanjutnya sehingga dapat menyebabkan kematian pada kultur embrio. Media kultur M16 dan HTF yang digunakan untuk kultur sel telur dan embrio sangat rentan terhadap kontaminasi. Kelembaban dan suhu di dalam inkubator merupakan faktor yang dapat menjadi sarana pertumbuhan organisme lain untuk dapat tumbuh dalam media kultur. Kontaminasi dapat berasal dari udara di luar

area untuk melakukan kultur dan dapat berasal dari alat yang digunakan untuk mempersiapkan medium kultur.

Faktor yang kedua adalah faktor yang berasal dari dalam medium kultur itu sendiri, seperti kondisi medium kultur dan zat tambahan sebagai suplementasi nutrisi bagi embrio untuk berkembang (Widjiati, 1997). Menurut Sukra dkk (1989) bahwa semakin kurang nutrisi yang ada dalam medium kultur, jumlah embrio yang berkembang makin menurun karena nutrisi untuk perkembangan semakin sedikit. Selama periode awal perkembangan ini kebutuhan energi yang dibutuhkan tinggi. Zat-zat sebagai sumber energi utama seperti piruvat, glukosa dan laktat ditambahkan ke dalam kultur embrio mamalia pada umumnya. Energi substrat tersebut dibutuhkan untuk mendukung perkembangan embrio praimplantasi dari tahap satu sel hingga mencapai tahap blastosis. Pemberian glukosa pada 36 sampai 48 jam setelah kultur dapat membantu perkembangan embrio mencit mencapai tahap blastula (Sawai *et al.*, 1996). Hal ini sejalan dengan pendapat Widjiati (1997) bahwa penambahan glukosa dengan konsentrasi 5,0 mmol/liter dapat meningkatkan pertumbuhan embrio sampai morula (34,5 %) dan tahap blastula (14,4%).

Zigot yang dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel dengan kualitas baik yang dikultur di dalam medium M16 dan medium HTF mempunyai daya tahan hidup dan kemampuan berkembang lebih lanjut. Dengan demikian medium kultur M16 dan HTF yang digunakan sebagai kultur embrio tahap dua sel tidak mempengaruhi morfologinya. Embrio yang berkualitas baik mempunyai kriteria sebagai berikut : kompak, ikatan satu blastomer dengan yang lainnya erat,

spherical (bulat). Blastomer-blastomernya sama baik ukuran, warna dan susunannya. Warnanya sedang (tidak terlalu pucat dan tidak terlalu gelap), sitoplasma tidak bergranulasi dan mempunyai *vesicle* berukuran sedang. Ruang *periviteline* kosong dan diameternya teratur. *Zona pellucida* rata menggelembung, tidak mengkerut atau kolaps serta tidak ada reruntuhan sel.

Medium yang digunakan untuk kultur embrio disusun berdasarkan tujuan penggunaan medium kultur dan materi yang akan dikultur. Kultur sel gamet relatif lebih homogen dibandingkan kultur jaringan atau organ, sedangkan jaringan embrio sampai fase blastosis relatif lebih homogen asalkan dipenuhi kebutuhan dasar lainnya untuk kultur (Hafez, 1993). Berdasarkan penjelasan di atas maka medium M16 dan medium HTF yang digunakan sebagai medium kultur dapat memenuhi kebutuhan dasar sel gamet untuk berkembang menjadi embrio sehingga tidak mempengaruhi morfologinya. Secara umum embrio memerlukan lingkungan yang sama dengan lingkungan yang diperlukan sel-sel mamalia lain yang dikultur. Unsur-unsur yang diperlukan untuk kultur *in vitro* embrio yang terkandung di dalam medium M16 dan medium HTF antara lain substrat, udara, air dan suhu. Substrat dalam medium kultur M16 dan medium HTF terdiri dari bahan-bahan kimia organik dan anorganik. Jumlah substrat yang ditambahkan ke dalam medium kultur tersebut diatur mendekati komposisi zat-zat dalam cairan tuba falopii tempat embrio berkembang. Substrat tersebut terdiri dari nutrisi ataupun zat-zat lain dalam bentuk yang terlarut. Nutrisi yang diberikan berupa sumber energi dan protein.

Dalam medium M16 dan medium HTF sumber energi yang ditambahkan kedalamnya adalah glukosa, piruvat dan laktat. Energi dalam substrat tersebut ditambahkan untuk mendukung perkembangan embrio praimplantasi dari tahap satu sel hingga mencapai tahap blastosis. Secara umum pH dalam medium kultur sel adalah 7,4 diluar pH tersebut sel tidak tumbuh dengan baik, walaupun pH yang optimum untuk pertumbuhan memiliki variasi yang kecil diantara berbagai jenis sel (Freshney, 1987). Adanya ion-ion seperti Ca, Mg, K dan PO_4 yang terkandung di dalam medium M16 dan medium HTF diperlukan untuk aktivitas enzim dan untuk menjaga osmolaritas sesuai dengan lingkungan asal organ atau sel (Malole, 1990). Osmolaritas yang dibutuhkan embrio mencit tahap satu sel berkisar antara 250-280 mOsm dan untuk dua sel berkisar antara 272-280 mOsm (Brinster, 1965). Dalam medium kultur M16 dan HTF, unsur utama udara yang diperlukan adalah karbondioksida. Karbondioksida merupakan unsur penting dan bermanfaat terhadap perkembangan embrio. Karbondioksida berhubungan dengan bufer bikarbonat yang digunakan dalam medium kultur. Keseimbangan antara CO_2 -karbonat sangat penting untuk mengatur keseimbangan pH. Sehingga untuk mengatur keseimbangan tekanan CO_2 di dalam dan di luar media dapat diberikan CO_2 5 % dalam udara. Keseimbangan antara CO_2 -karbonat yang berhubungan dengan keseimbangan pH juga berhubungan dengan suhu. Suhu dapat mempengaruhi pH melalui peningkatan kelarutan CO_2 pada suhu rendah dan mungkin melalui perubahan ionisasi dan pH dari bufer. Keseimbangan diantara ketiga hal tersebut harus benar-benar dijaga sebab ketiganya mempunyai pengaruh langsung terhadap pertumbuhan sel.

Air dalam kultur sel digunakan sebagai pelarut bahan-bahan kimia penyusun medium, selain itu air juga sebagai media pengantar zat-zat yang dibutuhkan untuk embrio berkembang. Unsur-unsur kimia penyusun medium kultur jika tercampur dengan logam atau unsur lain yang dapat hadir di dalam air akan berpengaruh toksik terhadap kultur. Unsur lain yang ditambahkan di dalam medium M16 dan medium HTF adalah serum yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA). Serum adalah cairan biologis yang terbukti dapat menunjang pertumbuhan sel di luar tubuh. Serum berfungsi memberikan sejumlah faktor penumbuh, mengandung hormon serta menyediakan protein pengikat yang membawa dan mengikat unsur-unsur yang berukuran kecil. Serum juga merupakan sumber bermacam-macam lemak yang secara umum dibutuhkan sel untuk hidup dan berkembang. Malole (1990) menyatakan bahwa mineral-mineral yang ada dalam serum terdapat sebagai elemen organik jarang misalnya Cu, Zn, Co, Mn, Mo, Va dan Se yang berperan sebagai kofaktor pada enzim misal untuk detoksifikasi sisa metabolik.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan maka kesimpulan yang dapat diambil:

1. Tidak terdapat perbedaan nyata ($p>0,05$) pada penggunaan medium M16 dan medium *Human Tubal Fluid* (HTF) terhadap angka fertilisasi.
2. Tidak terdapat perbedaan nyata ($p>0,05$) pada penggunaan medium M16 dan HTF terhadap perkembangan embrio mencit tahap dua sel.

6.2. Saran

Dengan tidak adanya perbedaan nyata ($p>0,05$) pada penggunaan medium M16 dan HTF terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio mencit tahap dua sel, maka penulis menyarankan untuk meneliti lebih lanjut penggunaan medium M16 dan HTF sebagai medium kultur *in vitro* mencit sampai mencapai tahap blastosis sehingga dapat diketahui perkembangan embrio lebih lanjut.

RINGKASAN

RINGKASAN

SRI ENDAH PUSPORINI. Perbandingan Penggunaan Medium M16 dan *Human Tubal Fluid* (HTF) Terhadap Angka Fertilisasi dan Perkembangan Embrio Mencit (*Mus musculus*) Tahap Dua Sel, di bawah bimbingan Widjiati, M.Si., Drh selaku pembimbing pertama dan Dr. Zainal Arifin, M.S., Drh selaku pembimbing kedua.

Penelitian mengenai medium kultur buatan yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* baik pada manusia maupun hewan telah banyak dilakukan (Bradley, 1987; Quinn *et al.*, 1985). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan penggunaan medium M16 dan medium HTF pada proses fertilisasi *in vitro* mencit (*Mus musculus*) ditinjau dari angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel.

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina, mencit jantan normal dan mencit jantan vasektomi berumur tiga bulan dengan strain BALB-C. Mencit betina dilakukan superovulasi dengan hormon PMSG 5 IU secara intra peritoneal dilanjutkan dengan hCG 5 IU secara intraperitoneal 48 jam kemudian. Segera setelah penyuntikan hCG mencit betina dicampur dengan pejantan vasektomi secara monomating untuk melakukan gertak birahi. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pembedahan pada mencit betina yang positif terdapat sumbat vagina untuk dilakukan koleksi sel telur pada kantung fertilisasinya. Spermatozoa yang digunakan diambil dari kauda epididimis pejantan normal. Sel telur dan spermatozoa yang telah dikoleksi diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada

suhu 37°C selama satu jam. Sel telur dan spermatozoa yang telah diinkubasi dilakukan fertilisasi *in vitro* pada masing-masing medium kultur. Lima jam setelah fertilisasi dilakukan pengamatan terhadap jumlah zigot yang terbentuk pada masing-masing medium kultur untuk mengetahui angka fertilisasi. Zigot yang diperoleh dipindahkan pada medium yang baru untuk melakukan kultur *in vitro*. Pengamatannya dilakukan 24 jam kemudian untuk mengetahui perkembangan embrio tahap dua sel.

Data yang diperoleh terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel dianalisis dengan menggunakan Uji t. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini terhadap angka fertilisasi pada medium M16 sebesar 76,89 % dan pada medium HTF sebesar 78,65 %. Untuk perkembangan embrio tahap dua sel pada medium M16 sebesar 67,91 % dan pada medium HTF 66,82 %. Dengan analisis statistik terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio tahap dua sel yang dikultur pada medium M16 dan medium HTF hasil yang diperoleh tidak berbeda nyata. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada penggunaan medium M16 dan HTF terhadap angka fertilisasi dan perkembangan embrio mencit tahap dua sel.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- A Cooper Surgical Company. 2003. Article of Quinn's Advantage Fertilization Medium. [http:// www.coopersurgical.com](http://www.coopersurgical.com).
- Bavister, B.D. 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 124. 2:181-196.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction* 3rd ed. Prentice Hall. Englewoods Cliff. New Jersey.
- Biggers, J. D. and J. A. Lawwits. 1991. Optimalization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fertil.* 2:543-556.
- Bradley, A. 1987. Production and Analysis of Chimeric Mice in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach. ED by E. J. Robertson. IRL Press. Washington DC. 5:113-152.
- Brinster, R. L. 1965. Studies on the developmental of mouse embryos *in vitro* : The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J. Exp. Zool.* 158:49-58.
- First, N. L and J. J. Parish. 1987. *In vitro* fertilization of ruminant. *J. Reprod. Fertil.* 34:151-165.
- Franson, R. D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi Keempat. Penerbit Universitas Gajah Mada. 969p.
- Freshney, R. I. 1987. *Animal Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press. Oxford. Washington DC. 247p.
- Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *J. Molec. Reprod. Dev.* 26:40-46.
- Funahashi, H., She-Hoon Oh and K. Miyoshi. 1998. Rat oocytes fertilized in modified rat 1-cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration and bovine serum albumine maintain ability to the blastocyst stage. *J. Biol. Reprod.* 59:884-889.
- Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effect on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 88:361-368.

- Gardner, D. K. and M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *J. Biol. Reprod.* 48:377-385.
- Gilbert, S. F. 1988. *Developmental Biology* 2nd ed. Sinauer Associate Inc Publisher. Sunderland. Massachusetts. 313-330p.
- Hafez, E. S. E. 1993. *Reproduction in Farm Animals* 6th edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animals* 7th edition. Lea and Febiger. Philadelphia. 509p.
- Hardjopranto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. 344p.
- Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. *Manipulating The Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. New York. 17-71pp.
- Hunter, R. H. F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung dan Penerbit Universitas Udayana. 454p.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak Edisi Kedua*. Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 99p.
- Jansen, R. 1997. *Overcoming Infertility*. Scientific American Books. <http://www.jansen.com.au/glossary.asp>.
- Mahaputra, L. 2001. *Diktat Ilmu Kebidanan Veteriner Edisi Kedua*. Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 120p.
- Malole, M. B. M. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Riset Antar Universitas-Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 77-117pp.
- McDonald, L. E. 1975. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. 484p.
- Miyoshi, K., H. Funahashi., K. Okuda and K. Niwa. 1994. Development of rat 1-cell embryos in chemically defined medium: effect of glucose, phosphate and osmolarity. *J. Reprod. Fertil.* 100:21-26.
- Monk, M. 1987. *Mammalian Development. A Practical Approach*. IRL Press. Washington DC. 313p.

- Nagy, A and J. Roosant. 2001. Preparation of Media for Embryo Culture. Practical Approach Series. Oxford University Press. <http://www.oup.co.uk/pdf/nagy/medium/htm>.
- Nalley, W. M. 2001. Tinjauan Filosofis Bioteknologi. Makalah Filsafat Sains. Program Pasca Sarjana (S₃). Institut Pertanian Bogor. http://www.hayati-ipb.com/users/rudyct/indiv2001/wm_nalley.htm.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Veteriner Jurusan Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara. Jakarta. 586p.
- Quinn, P., G. M. Warren., J. F. Kerin and C. Kirby. 1984. Culture factors in relation to the success of human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *J. Fert.Steril.* 2:202-209.
- Quinn, P., J. F. Kerin and G. M. Warren. 1985. Improved pregnancy rate in human *in vitro* with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *J. Fert. Steril.* 44:493-498.
- Rijnders. P. M. 1996. Laboratory Aspect of *In Vitro* Fertilization. N. V. Organon. Netherland. 75-174pp.
- Sawai, K., J. H. Kim., K. Okuda and K. Niwa. 1994. Effect of glucose in semidefined culture medium on development of mouse 1-cell embryos. *J. Mamm. Ova. Reprod.* 11:8-16.
- Singgih, S. 2001. Mengolah Data Secara Profesional. SPSS Versi 10. PT Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia. Jakarta. 573p.
- Sudjana. 1996. Metode Statistika Edisi Keenam. Penerbit Tarsito. Bandung. 508p.
- Sukra, Y. L., Rahardja dan I. Djuwita. 1989. Embriologi I. PAU. IPB. Bogor.
- Sukra, Y. L., Rahardja, A. Boediono dan S. Golfiani. 1993. Studi Tentang Pengembangan Teknik Fertilisasi *In Vitro*, Kultur, Pewarnaan Kromosom dan Pematangan Embrio. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian. Cisarua. Bogor.
- Supriatna, I dan Pasaribu. 1992. *In Vitro* Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 150p.
- Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 327p.

- Tomaswezka, M. W., I. K. Utama., I. G. Putu dan T. D. Chaniago. 1991. *Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 240p.
- Widjiati. 1997. *Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya Dalam Medium Kultur In Vitro Terhadap Perkembangan Embrio Mencit*. Tesis. IPB Bogor.
- Yanagimachi, R. 1970. *In vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. *J. Biol. Reprod.* 3:147.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik Angka Fertilisasi Dengan Uji t

Summarize

Case Summaries^a

			Jumlah Sel Telur	Fertilisasi	Persentase Fertilisasi	Pre Transformasi	Transformasi Arc Sin Vy%
Perlakuan HTF	1		14	14	100.000	95.833	78.221
	2		11	11	100.000	95.833	78.221
	3		7	7	100.000	95.833	78.221
	4		39	38	97.436	97.436	80.786
	5		36	36	100.000	95.833	78.221
	6		42	42	100.000	95.833	78.221
	Total	N	6	6	6	6	6
		Sum	149	148	597.436	576.603	471.891
		Mean	24.83	24.67	99.57265	96.10043	78.64850
		SD	15.791	15.616	1.046790	.654244	1.047157
M16	1		16	16	100.000	95.833	78.221
	2		10	10	100.000	95.833	78.221
	3		11	11	100.000	95.833	78.221
	4		35	31	88.571	88.571	70.241
	5		32	32	100.000	95.833	78.221
	6		36	36	100.000	95.833	78.221
	Total	N	6	6	6	6	6
		Sum	140	136	588.571	567.738	461.346
		Mean	23.33	22.67	98.09524	94.62302	76.89100
		SD	12.291	11.622	4.665695	2.964660	3.257821
Total	N	12	12	12	12	12	
	Sum	289	284	1186.007	1144.341	933.237	
	Mean	24.08	23.67	98.83394	95.36172	77.76975	
	SD	13.514	13.166	3.314851	2.187453	2.482962	

a. Limited to first 100 cases.

T-Test

Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Transformasi Arc Sin Vy% HTF	6	78.64850	1.047157	.427500
M16	6	76.89100	3.257821	1.330000

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Transformasi Arc Sin Vy%	Equal variances assumed	2.608	.137	1.258	10	.237	1.75750	1.397017
	Equal variances not assumed			1.258	6.022	.255	1.75750	1.397017

Lampiran 2. Analisis Statistik Perkembangan Embrio Mencit Tahap Dua Sel Dengan Uji t.

Summarize

Case Summaries^a

			Dua Sel	Dua Sel (%)	Pre Transformasi	Transformasi Arc Sin Vy%
Perlakuan HTF	1		6	42.857	42.857	40.893
	2		8	72.727	72.727	58.517
	3		7	100.000	95.833	78.221
	4		33	84.615	84.615	66.906
	5		36	100.000	95.833	78.221
	6		42	100.000	95.833	78.221
	Total	N	6	6	6	6
		Sum	132	500.200	487.700	400.979
		Mean	22.00	83.36663	81.28330	66.82983
		SD	16.697	22.741068	20.957043	15.040641
M16	1		12	75.000	75.000	60.000
	2		10	100.000	95.833	78.221
	3		9	81.818	81.818	64.760
	4		21	60.000	60.000	50.768
	5		30	93.750	93.750	75.522
	6		36	100.000	95.833	78.221
	Total	N	6	6	6	6
		Sum	118	510.568	502.235	407.492
		Mean	19.67	85.09470	83.70581	67.91533
		SD	11.325	15.884789	14.396938	11.286404
Total	N	12	12	12	12	
	Sum	250	1010.768	989.935	808.471	
	Mean	20.83	84.23067	82.49455	67.37258	
	SD	13.657	18.723763	17.188667	12.690562	

a. Limited to first 100 cases.

T-Test

Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Transformasi Arc Sin Vy% HTF	6	66.82983	15.040641	6.140316
M16	6	67.91533	11.286404	4.607655

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Transformasi Arc Sin Vy%	Equal variances assumed	.266	.617	-.141	10	.890	-1.08550	7.676846
	Equal variances not assumed			-.141	9.275	.891	-1.08550	7.676846

Lampiran 3. Komposisi Medium M16

Komposisi medium M16 (dalam g/L) :

NaCl	5,334
KCl	0,356
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,252
KH ₂ PO ₄	0,162
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,293
NaHCO ₃	2,101
Na Laktat	2,610
	Atau 4,349 (syr. 60 %)
Na Piruvat	0,036
Glukosa	1,000
BSA	4,000
Penicillin G (konsentrasi akhir 100U/ml)	0,060
Streptomycin Sulfat (konsentrasi akhir 50 g/ml)	0,050
Phenol Red	0,010
DW	sampai 1 liter ¹

¹ Sumber : Practical Approach Series : Preparation of Media for Embryo Culture, Oxford University Press. <http://www.oup.co.uk/pdf/nagy/medium.htm>.

Lampiran 4. Komposisi Medium HTF

Komposisi medium HTF (dalam g/L) :

NaCl	5,9375
KCl	0,3496
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0492
KH ₂ PO ₄	0,0504
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3
Glukosa	0,5
Na Piruvat	0,0365
Na Laktat	3,42 mL
Penicillin	0,075
Streptomisin	0,05
Phenol Red (1 %)	0,20 mL
BSA	4,0 ²

² Sumber : Article of Quinn's Advantage Fertilization Medium. A Cooper Surgical Company.
<http://www.coopersurgical.com>.

Lampiran 5. Pengenceran Hormon**- Pengenceran PMSG**

Dalam 1 vial hormon terdapat 1000 IU PMSG

1000 IU PMSG + 5 ml pelarut → 1 ml larutan 200 IU PMSG

200 IU PMSG + 3 ml pelarut → 1 ml larutan 50 IU PMSG

0,1 ml larutan 5 IU PMSG

- Pengenceran hCG

Dalam 1 vial hormon terdapat 1500 IU PMSG

1500 IU PMSG + 5 ml pelarut → 1 ml larutan 300 IU PMSG

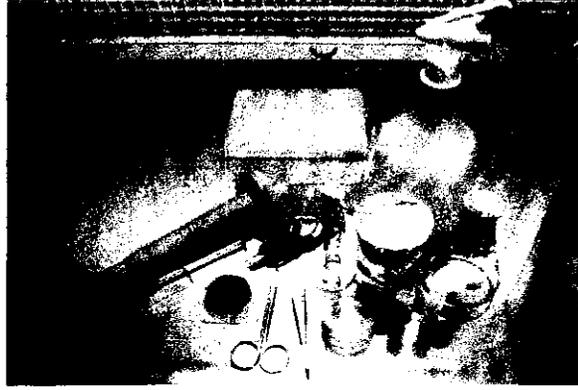
300 IU PMSG + 5 ml pelarut → 1 ml larutan 50 IU PMSG

0,1 ml larutan 5 IU PMSG

Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



Bahan Penelitian



Peralatan Penelitian