

TESIS

**PENGARUH SUPLEMENTASI INSULIN TRANSFERRIN
SELENIUM (ITS) PADA MEDIA MATURASI TCM-199
TERHADAP DIAMETER DAN EKSPRESI
MATURATION PROMOTING FACTOR
(MPF) OOSIT SAPI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh

REZA MAHENDRA YUDHA PERMANA
NIM 061314153005

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2015

**PENGARUH SUPLEMENTASI INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM
(ITS) PADA MEDIA MATURASI TCM-199 TERHADAP DIAMETER
DAN EKSPRESI MATURATION PROMOTING FACTOR (MPF)
OOSIT SAPI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**REZA MAHENDRA YUDHA PERMANA
NIM 061314153005**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2015**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**PENGARUH SUPLEMENTASI INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM
(ITS) PADA MEDIA MATURASI TCM-199 TERHADAP DIAMETER
DAN EKSPRESI MATURATION PROMOTING FACTOR (MPF)
OOSIT SAPI**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 18 Agustus 2015



Reza Mahendra Yudha Permana
NIM 061314153005

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 18 Agustus 2015

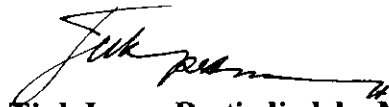
Oleh:

Pembimbing Ketua



Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.
NIP. 195905181987011002

Pembimbing



Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si.
NIP. 196109111989031002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.
NIP. 195409181983012001

Usulan Penelitian Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 13 Juli 2015

PANITIA PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS

Ketua : Dr. Budi Utomo, drh., M.Si

Anggota : 1. Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si

2. Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S

3. Dr. Widjiati, drh., M.Si

4. Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes

Hasil Penelitian Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada:

Tanggal : 13 Agustus 2015

PANITIA PENGUJI HASIL PENELITIAN TESIS

Ketua : Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S

Anggota : 1. Dr. Widjiati, drh., M.Si
2. Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes
3. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si
4. Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.S

Yudha Prawira yang telah banyak membantu selama pelaksanaan penelitian. Aris Juliprihanto, drh., M.Vet. yang banyak sekali memberikan masukan, motivasi dan mendengarkan selama proses penyelesaian tesis ini.

Keluarga angkatan 2013 S2-Ilmu Biologi Reproduksi, Yhogga Pratama Dinata, drh., Dikky Eka Mandala Putranto, drh., Yanita Mutiaraning Viastika, drh., Novarina Sulsia I., drh., Siti Eliana Rochmi, drh., Rina Puji Astuti, drh., Ayu Ira Marita, drh., dan Anna Ismawati, drh. atas kebersamaannya selama ini,

Serta pihak-pihak lain yang sangat membantu dalam penyelesaian tesis ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Surabaya, 18 Agustus 2015

Penulis

Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada:

Tanggal : 18 Agustus 2015

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S

Anggota : 1. Dr. Widjiati, drh., M.Si

2. Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes

3. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si

4. Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.S

Surabaya, 18 Agustus 2015

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 195312161978062001

pengukuran diameter oosit menggunakan ImageRaster 4.0.5 dan identifikasi ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) dengan pewarnaan Imunositokimia metode *streptavidin biotin complex*.

Hasil penelitian suplementasi ITS P₀ (0 µg/ml) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dengan P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), dan P₃ (20 µg/ml) dalam peningkatan diameter oosit sedangkan ekspresi MPF P₀ (0 µg/ml) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dengan P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), dan P₃ (20 µg/ml). Ekspresi MPF menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata yaitu pada P₁ (10 µg/ml) dan P₂ (15 µg/ml) ($p > 0,05$). Kesimpulan dari suplementasi ITS pada medium maturasi TCM-199 tidak dapat meningkatkan diameter oosit namun, dapat meningkatkan ekspresi MPF pada maturasi oosit sapi secara *in vitro*.

SUMMARY

Effect of Insulin Transferrin Selenium (ITS) Supplementation in Maturation Medium TCM -199 to Diameter and Maturation Promotion Factor (MPF) Expression Bovine Oocyte

Developmental of animal reproduction biotechnology provides benefits for human life, especially livestock world such as artificial insemination and embryo transfer. Embryo transfer requires a lot of embryos using in vitro culture (IVC) consist in vitro maturation (IVM) and in vitro culture (IVC). An embryos quality from maturing oocyte which immature carried on IVM, IVF and IVC not higher than 20-30% used basic technique. Oocyte maturation was done in incubator at 38,5°C with CO₂ 5% and humidity 95% so it could increase the Reactive Oxygen Species (ROS) production. IVM methods for oocyte maturation are affected by supplementation usage, oocyte quality, contaminated risk, and culture medium. Insulin Transferrin Selenium (ITS) supplementation in maturation medium can increase the number of mature oocytes. Oocyte maturation also influenced of MPF (Maturation Promoting Factor). High MPF Activity is one of the sign that oocyte in Metaphase II (MII) or oocyte have matured and ready for fertilization. Oocyte diameter affect the ability of oocytes to reach MII. Larger oocyte diameter have a greater ability to achieve meiosis I. Whereas, oocytes derived from larger follicle have a better chance to reach metaphase II. In other words, oocyte diameter realated to quality of oocyte produced.

This study was to determine role of Insulin Transferrin Selenium to bovine oocyte were matured in vitro against improved oocyte diameter and Maturation Promoting Factor (MPF) as maturation mediator by immunocytochemistry using streptavidin biotin complex method.

This study was conducted in Laboratorium In Vitro and Laboratorium Patologi Veteriner Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University on July to August 2015. The study design used Completely Randomized Design (CRD). Sampling was done by bovine ovarian follicle aspiration obtained from slaughterhouse. Aspirated follicles are 2-6 mm using disposable syringe with Needle 18G. Oocytes from aspirated follicles are washed by PBS three times and twice in maturation medium.

Maturation process used TCM-199 medium which added by FSH 100 IU/ml, LH 100 IU/ml, BSA 3% and ITS (Insulin Transferrin Selenium). ITS dose which used in culture medium are different for each treated group. The treated groups are P₀ (0 µg/ml), P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), and P₃ (20 µg/ml). Each petridish has four drops maturation medium 50 µg/ml coated by mineral oil then incubated in incubator at 38,5°C with CO₂ 5% and humidity 95% due 22 hours then evaluated using ImageRaster 4.0.5 for measuring oocytes diameter and streptavidin biotin method immunocytochemistry staining for Maturation Promoting Factor expression identification.

Result of this study showed that ITS supplementation in maturation medium has no significantly difference ($p>0,05$) for all treated groups (P_0 , P_1 , P_2 , and P_3) of oocyte diameter improvement. In other way, ITS supplementation P_0 (0 $\mu\text{g/ml}$) has significantly difference ($p<0,05$) compared P_1 (10 $\mu\text{g/ml}$), P_2 (15 $\mu\text{g/ml}$) and P_3 (20 $\mu\text{g/ml}$) of MPF expression but MPF expression of P_1 (10 $\mu\text{g/ml}$) and P_2 (15 $\mu\text{g/ml}$) has no significantly difference ($p>0,05$). Conclusion of ITS supplementation in maturation medium TCM-199 can't increase oocyte diameter but can increase MPF expression of bovine oocyte were matured in vitro.

**EFFECT OF INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM (ITS)
SUPPLEMENTATION IN MATURATION MEDIUM
TCM -199 TO DIAMETER AND MATURATION
PROMOTION FACTOR (MPF) EXPRESSION
BOVINE OOCYTE**

Reza Mahendra Yudha Permana

ABSTRACT

Insulin Transferrin Selenium (ITS) has been used in vitro maturation system to support in vitro maturation of oocyte. The study aims was to determine role of Insulin Transferrin Selenium to bovine oocyte was matured in vitro against improved oocyte diameter and Maturation Promoting Factor (MPF) as maturation mediator by immunocytochemistry using streptavidin biotin complex method. Maturation process used TCM-199 medium which added by FSH 100 IU/ml, LH 100 IU/ml, BSA 3% and ITS (Insulin Transferrin Selenium). ITS dose which used in culture medium are different for each treated group. The treated groups are P₀ (0 µg/ml), P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), and P₃ (20 µg/ml). Oocytes were incubated in incubator at 38,5°C with CO₂ 5% and humidity 95% due 22 hours. The result showed that ITS supplementation in maturation medium has no significantly difference ($p > 0,05$) for all treated groups (P₀, P₁, P₂, and P₃) of oocyte diameter improvement. In contrary, ITS supplementation P₀ (0 µg/ml) has significantly difference ($p < 0,05$) compared P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml) and P₃ (20 µg/ml) of MPF expression but MPF expression of P₁ (10 µg/ml) and P₂ (15 µg/ml) has no significantly difference ($p > 0,05$). In conclusion of ITS supplementation in maturation medium TCM-199 can't increase oocyte diameter but can increase MPF expression of bovine oocyte were matured in vitro.

Key Words: oocyte, in vitro maturation, Insulin Transferrin Selenium, diameter, Maturation Promoting Factor

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	19
3.1 Kerangka Konseptual.....	19
3.2 Hipotesis.....	21
BAB 4 METODE PENELITIAN	22
4.1 Rancangan Penelitian.....	22
4.2 Populasi dan Besar Sampel.....	22
4.2.1 Populasi.....	22
4.2.2 Besar Sampel.....	22
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	23
4.3.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>).....	23
4.3.2 Variabel Tergantung (<i>Dependent Variable</i>).....	23
4.3.3 Variabel Kendali.....	23
4.3.4 Definisi Operasional Variabel.....	24
4.4 Bahan Penelitian.....	24
4.5 Peralatan Penelitian.....	25
4.6 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
4.7 Prosedur Penelitian.....	25
4.7.1 Koleksi Oosit.....	25
4.7.2 Maturasi Oosit.....	26
4.7.3 Pengukuran Diameter Oosit.....	27
4.7.4 Identifikasi Ekspresi <i>Maturation Promoting Factor</i> (MPF) dengan Metode Imunositokimia.....	27
4.8 Analisis Data.....	28
4.9 Kerangka Operasional Penelitian.....	29
BAB 5 HASIL PENELITIAN	30
5.1 Pengukuran Diameter Oosit.....	30
5.2 Data Pengukuran Ekspresi <i>Maturation Promoting Factor</i> (MPF).....	32
BAB 6 PEMBAHASAN	35
6.1 Diameter Oosit.....	35
6.2 Ekspresi <i>Maturation Promoting Factor</i>	37
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	42
7.1 Kesimpulan.....	42
7.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Pengaruh Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Media Maturasi TCM-199 Terhadap Diameter Oosit Sapi yang dimaturasi <i>in vitro</i>	30
5.2 Skala Semikuantitatif IRS Merupakan Hasil Perkalian Antara Skor Prosentase Sel Positif (A) dengan Skor Intensitas Reaksi Warna (B).....	32
5.3 Pengaruh Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Media Maturasi TCM-199 Terhadap Ekspresi <i>Maturation Promoting Factor</i> (MPF) Oosit Sapi Dimaturasi <i>in vitro</i>	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
5.1 Pengukuran Diameter Vertikal dan Horizontal Oosit Sapi Sebelum dan Sesudah Maturasi <i>in vitro</i> dengan <i>software</i> ImageRaster Pada Perbesaran 100X.....	31
5.2 Hasil Pewarnaan Imunositokimia Pada Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Media Maturasi TCM-199 Terhadap Ekspresi <i>Maturation Promoting Factor</i> (MPF) Oosit Sapi yang Dimaturasi <i>in vitro</i> Pada Perbesaran 400X.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Besar Sampel.....	49
2. Metode Pewarnaan Imunositokimia.....	50
3. Pengukuran Panjang Diameter Dengan Menggunakan ImageRaster.....	51
4. Hasil Pengukuran Diameter Oosit.....	52
5. Hasil Ekspresi MPF.....	57
6. Uji Statistik.....	59

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ABC	: <i>Avidin Biotin Complex</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosin Monophosphate</i>
CAK	: <i>Cell Activated Kinase</i>
Cdc2	: <i>Cell division cycle 2</i>
Cdc25C	: <i>Cell division cycle 25C</i>
CDK	: <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDK-1	: <i>Cyclin-Dependent Kinase 1</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GSH	: <i>Glutation</i>
GVBD	: <i>Germinal Vesicle Breakdown</i>
IB	: <i>Inseminasi Buatan</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
ITS	: <i>Insulin Transferrin Selenium</i>
IU	: <i>Internasional Unit</i>
IVC	: <i>In Vitro Culture</i>
IVF	: <i>In Vitro Fertilization</i>
IVM	: <i>In Vitro Maturation</i>
LAB	: <i>Labelled Avidin Biotin</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
M	: <i>Mitosis</i>
MII	: <i>Metafase II</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
M1	: <i>Meiosis 1</i>
MPF	: <i>Maturation Promoting Factor</i>
PAP	: <i>Peroksidase-Anti Peroksidase</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	: <i>Potential of Hidrogen</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PKB	: <i>Protein Kinase B</i>
Plk	: <i>Polo-like kinase</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
RNA	: <i>Ribonucleatic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPH	: <i>Rumah Potong Hewan</i>
TCM-199	: <i>Tissue Culture Medium 199</i>
TE	: <i>Transfer Embrio</i>
Thr-14	: <i>Threonin 14</i>
Thr-16	: <i>Threonin 16</i>
Tyr-15	: <i>Tyrosin 15</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan bioteknologi reproduksi ternak banyak memberikan manfaat bagi manusia khususnya dalam dunia peternakan. Teknologi tersebut antara lain adalah inseminasi buatan (IB) yang telah memasyarakat dan sudah membuahkan hasil serta transfer embrio (TE) yang saat ini masih dikembangkan dapat dilakukan untuk memperbanyak embrio. Untuk keperluan transfer embrio dibutuhkan embrio dalam jumlah yang banyak. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan aplikasi teknologi *in vitro fertilization* (IVF) meliputi *in vitro maturation* (IVM) dan *in vitro culture* (IVC) (Daoed dkk., 2013).

Ketersediaan oosit yang matang dalam kegiatan IVF sangat menunjang kelancaran pelaksanaan program TE. Oosit yang belum matang dapat diperoleh melalui dua cara yaitu melalui aspirasi ovarium yang diperoleh dari RPH (Rumah Potong Hewan) atau dari hewan hidup dengan menggunakan laparoskopi atau ultrasonografi. Ovarium yang berasal dari RPH merupakan hal yang paling mudah dilakukan dan dengan biaya yang sangat murah sebagai sumber oosit untuk keperluan IVM sehingga dapat memudahkan IVF (Firmiatty dkk., 2014).

Maturasi oosit secara *in vitro* merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan IVF. Untuk memproduksi oosit matang kualitas baik turut dipengaruhi oleh media kultur selama proses maturasi. Oosit matang yang siap digunakan dalam IVF adalah oosit matang pada metafase II (MII) karena pada saat itu metabolisme oosit optimal dan memiliki cukup energi untuk

melakukan pembelahan (Hyttel *et al.*, 1997). Dalam melakukan kultur oosit, kondisi media kultur harus sama dengan kondisi dengan lingkungan *in vivo*. Apabila lingkungan kultur berbeda dengan kondisi *in vivo* dapat menyebabkan berkurangnya interaksi antar sel dan interaksi matriks dengan sel, sehingga berpengaruh terhadap proliferasi sel (Chotimah dkk., 2014).

Maturasi oosit secara *in vitro* sangat bergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro*, kualitas oosit yang digunakan, resiko kontaminasi, dan media kultur. Suplemen yang digunakan dan kondisi kultur yang baik menunjang dalam meningkatkan kemampuan maturasi oosit secara *in vitro* (Daoed dkk., 2013).

Optimalisasi maturasi *in vitro* antara lain dipengaruhi oleh klasifikasi oosit, penambahan zat aditif berupa *growth factor* dan hormon (Shen *et al.*, 2008), maupun antioksidan. Klasifikasi oosit yang didasarkan keutuhan struktur oosit berpengaruh terhadap maturasi dan perkembangan oosit secara *in vitro* (Kańska-Książkiewicz *et al.*, 2007).

Jumlah embrio hasil kultur oosit yang belum matang melalui kegiatan IVM, IVF, dan IVC rendah yaitu 20-30% yang diakibatkan karena masih terbatasnya informasi mengenai kebutuhan oosit sapi untuk dapat mengalami pematangan oosit secara normal pada saat dilakukan kultur (Bowles and Lishman, 1998). Disamping itu, pemeriksaan kualitas hasil kultur *in vitro* oosit belum pernah dilakukan sehingga perlu dilakukan eksplorasi terhadap hasil pematangan oosit *in vitro* yang diharapkan dapat meningkatkan hasil produksi embrio.

Insulin Transferin Selenium (ITS) dapat digunakan untuk maturasi oosit secara *in vitro*. ITS terdiri dari senyawa senyawa insulin, transferrin, dan selenium serta telah dijual secara komersial (Liu *et al.*, 2014). ITS dapat ditambahkan sebagai suplemen maupun promotor pada perkembangan oosit dan dapat digunakan dalam IVM pada oosit tikus, oosit sapi, maupun kambing. Insulin dalam ITS dapat meningkatkan *uptake* glukosa dan asam amino serta memiliki efek mitogenik sedangkan transferrin dan selenium memiliki aktivitas seperti anti oksidan (Jeong *et al.*, 2008). Dengan suplementasi ITS, jumlah oosit matang akan meningkat (Firmiaty, 2014).

Maturasi oosit turut dipengaruhi oleh peran MPF (*Maturation Promoting Factor*). MPF merupakan kompleks protein kinase yang terdiri atas komponen regulator (Cyclin-B) dan komponen katalitik (*Cell division cycle 2/Cdc2*) (Bhattacharya *et al.*, 2007). Regulasi MPF sebagai mediator proses maturasi terjadi melalui proses fosforilasi dan defosforilasi. MPF teraktivasi apabila Cdc2 yang berikatan dengan Cyclin-B mengalami fosforilasi pada Threonin-161 (Thr-161) oleh *Cyclin Activated Kinase* (CAK). Sebaliknya MPF akan inaktif apabila aktivitas Cdc2 dihambat oleh enzim tirosin kinase, Wee1, pada Threonin-14 (Thr-14) dan Tyrosin-15 (Tyr-15) Cdc2. Akibatnya, terjadi akumulasi cyclin-B dikarenakan Cdc2 tak mampu berikatan dengan Cyclin-B. Untuk mengaktivasi MPF, Cdc2 akan mengalami defosforilasi oleh *Cell division cycle 25C* (Cdc25C) dengan bantuan aktivator *Polo-like kinase* (Plk) 1 sehingga Cdc2 mampu berikatan dengan Cyclin-B dan MPF aktif. Saat diaktifkan sel akan memasuki fase mitosis (M). Maturasi oosit ditandai oleh aktivitas MPF tinggi yaitu pada waktu

kelanjutan pembelahan meiosis dan selama penghentian meiosis pada metafase II (MII). Selama selang waktu antara kedua hal tersebut, MPF dipertahankan pada tingkat yang cukup tinggi (Kakisina dan Indra, 2008).

Sistem kultur seperti jenis medium, pH, suhu, kondisi lingkungan, lama inkubasi pada saat proses maturasi *in vitro* turut mempengaruhi keberhasilan kualitas oosit yang dihasilkan. Faktor lain yang menentukan kualitas oosit adalah diameter oosit. Oosit yang mempunyai diameter lebih besar akan mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk mencapai meiosis I, oosit yang berasal dari folikel yang lebih besar mempunyai peluang yang lebih besar untuk mencapai metafase II dibanding oosit yang berasal dari folikel yang berdiameter lebih kecil. Oosit sapi maupun kambing yang berasal dari folikel antrum kecil memiliki kemampuan yang rendah untuk mengalami GVBD (*Germinal Vesicle Breakdown*) dan meiosis I. Dengan kata lain, diameter oosit mempunyai keterkaitan dengan kualitas oosit yang dihasilkan (Syamsudin, 2014).

Berdasarkan permasalahan di atas maka penelitian ini ingin mengetahui suplementasi Insulin Trasferrin Selenium (ITS) yang bermanfaat dalam peningkatan jumlah oosit matur terhadap ekspresi *Maturation-Promoting Factor* (MPF) dan diameter oosit sapi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka dapat dirumuskan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada oosit sapi yang dimaturasi secara *in vitro* dapat meningkatkan diameter oosit?
2. Apakah suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada oosit sapi yang dimaturasi secara *in vitro* dapat meningkatkan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui peran Insulin Transferrin Selenium (ITS) terhadap ekspresi *Maturing Promoting Factor* (MPF).

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui peningkatan diameter oosit pada sapi yang dimaturasi *in vitro* dengan penambahan Insulin Transferrin Selenium (ITS).
2. Mengetahui ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) pada oosit sapi yang dimaturasi *in vitro* dengan penambahan Insulin Transferrin Selenium (ITS).

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberi informasi tentang Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada proses maturasi oosit *in vitro*.
2. Memberi informasi tentang peran *Maturation Promoting Factor* (MPF) terkait dengan perkembangan oosit.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alat Reproduksi Hewan Betina

Organ reproduksi betina terdiri atas ovarium, oviduk, uterus, serviks, vagina dan vulva. Pada umumnya, ovarium terdapat dua buah yaitu ovarium kanan dan ovarium kiri serta terletak pada rongga pelvis. Oviduk (tuba falopi) merupakan saluran dalam alat reproduksi betina yang kecil, berliku dan secara tidak langsung sebagai penghubung antara ovarium dan uterus (Hafez and Hafez, 2000).

Uterus pada umumnya terdiri dua buah tanduk uterus (korna uteri), satu badan uterus (korpis uteri), dan serviks. Tipe uterus sapi adalah uterus bipartitus sama seperti pada kambing, domba, dan kuda. Tipe uterus bipartitus mempunyai satu servik, satu korpis uteri, serta mempunyai dua kornua uteri (Widayati, 2014).

2.2 Ovarium

Ovarium merupakan alat kelamin betina yang bertanggung jawab terhadap perkembangan dan pelepasan oosit matur untuk fertilisasi. Ovarium memproduksi hormon steroid (estrogen dan progesteron) yang memungkinkan berkembangnya ciri-ciri seksual betina sekunder dan mendukung kebuntingan. Pada sapi terdapat dua buah ovarium yaitu di sebelah kanan dan kiri yang terletak di dalam rongga pelvis. (Hafez and Hafez, 2000).

Ovarium merupakan bagian organ kelamin betina yang utama, bentuk dan ukuran ovarium, berbeda-beda setiap spesies, umur, dan status reproduksinya. Pada sapi ovarium berbentuk oval dan bervariasi dalam ukuran menurut struktur yang berada di dalamnya (Sobari dkk., 2012). Ovarium sebelah kanan biasanya lebih besar daripada ovarium sebelah kiri. Sapi memiliki ovarium dengan ukuran panjang sekitar 3,8 cm, lebar 2 cm, dan tinggi 1,5 cm (Frandsen *et al.*, 2009).

Secara normal ovarium terletak di perbatasan kranial ligamentum lata uteri pada rantai ventrolateral pelvis dekat gerbang dalam pelvis. Pada umumnya ovarium bertaut pada mesovarium, sedangkan bagian ovarium yang tidak bertaut menonjol pada cavum abdomen dan pada permukaan ini folikel menonjol keluar (Ismudiono dkk., 2010).

Ovarium terdiri dari bagian dalam yang disebut medula dan bagian luar disebut korteks. Bagian korteks ditemukan berbagai bentukan sel telur yang sedang berkembang. Bentuk tersebut berupa oogonium yang sedang tumbuh menjadi folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, dan ovum (Soenardirahardjo dkk., 2012). Aliran darah pada ovarium berasal dari arteria ovarii, merupakan cabang dari arteri uteri-ovarii. Inervasi saraf dilakukan oleh saraf-saraf otonom dari plexus ovarii yang berasal dari plexus-plexus renalis dan aorticus (Ismudiono dkk., 2010).

Secara histologis, ovarium terdiri atas lapisan germinal epitelium, tunika albuginea, korteks ovarium, medula ovarium dan folikel ovarium. Germinal epitelium merupakan lapisan terluar yang menutupi ovarium sedangkan tunika

albuginea merupakan jaringan ikat padat dibawah germinal epithelium yang menyebabkan warna keputihan pada ovarium (Mescher, 2013).

Korteks ovarium terletak dibawah tunika albuginea, merupakan daerah yang ditempati folikel ovarium dan oositnya. Folikel ini terbenam dalam jaringan ikat (stroma) korteks ovarium. Medula ovarium terletak dibawah korteks ovarium, merupakan bagian terdalam ovarium. Tidak ada batas tegas antara daerah korteks dan medula, tetapi daerah medula tersusun dari jaringan ikat longgar dan berisi pembuluh darah, pembuluh limfe, dan saraf (Mescher, 2013).

2.3 Oogenesis

Oogenesis merupakan pembentukan ovum dalam ovarium yang ditandai perubahan oogonium menjadi oosit matur sehingga siap untuk melakukan fertilisasi (Isnaeni, 2006). Secara umum, oogenesis terbagi atas tiga tahap yaitu tahap pembentukan oogonia (proliferasi), tahap pertumbuhan (meiosis), dan tahap maturasi (transformasi) (Soenardirahardjo dkk., 2012).

Sel germinal primordial membagi diri secara mitosis pada tahap proliferasi. Hasil proliferasi berupa oogonium. Jumlah oogonium pada setiap ovarium berkisar antara 40.000 – 300.000 atau bahkan lebih tergantung pada jenis hewan. Tahap pertumbuhan dimulai sejak fetus hingga mencapai dewasa kelamin yang ditandai oleh isi sitoplasma bertambah banyak oleh kuning telur (deuteroplasma), membrane sel membentuk zona pelusida dan terjadi proliferasi sel-sel folikel. Sel-sel folikel berperan dalam memberikan nutrisi dan pengasuh pada deuteroplasma. Pada tahap pertumbuhan, yang dihasilkan adalah oosit

primer. Pertumbuhan oogonium menjadi oosit primer terbagi atas dua tahap. Tahap pertama, terjadi pertumbuhan yang cepat disertai dengan perkembangan folikel hingga terbentuknya antrum folikel. Tahap kedua, oosit tidak bertambah besar, namun yang berkembang adalah folikel akibat hormon yang dihasilkan oleh kelenjar hipofisa (Soenardirahardjo dkk., 2012).

2.4 Pertumbuhan dan Perkembangan Folikel

Proses perkembangan folikel mulai berjalan semenjak betina mengalami dewasa kelamin hingga terjadi ovulasi yang menghasilkan satu oosit fungsional pada setiap siklusnya (Boediono, 2010). Proses pertumbuhan dan perkembangan folikel terbagi menjadi beberapa tahapan yaitu tahap pertama (pembentukan folikel primer), tahap kedua (pembentukan folikel sekunder), tahap ketiga (pembentukan folikel tertier) dan tahap keempat (pembentukan folikel de Graff) (Partodihardjo, 1992).

Tahap pertama terjadi pada saat hewan betina masih berada dalam kandungan hingga lahir. Pada tahap ini terjadi pertumbuhan folikel primer yang berasal dari satu sel primordial yang membelah diri. Pada folikel primer, sel telur dikelilingi oleh sel-sel granulosa. Folikel primer kemudian berkembang menjadi folikel sekunder. Pada folikel sekunder, sel telur dilapisi dua lapis sel-sel granulosa dan memiliki pembungkus yang disebut membrana vitelin dan zona pelusida. Pertumbuhan folikel primer menjadi folikel sekunder adalah pertumbuhan tahap kedua yang terjadi setelah hewan betina lahir dan mengalami pendeewasaan tubuh (Partodihardjo, 1992). Folikel sekunder memiliki diameter

0,08-0,25 mm dan lebih besar dibandingkan dengan folikel primer yang memiliki diameter 0,04-0,08 mm (Adams and Singh, 2015).

Folikel sekunder akan menjadi folikel tersier. Pada tahap ketiga ini, terjadi pada saat hewan betina menjadi dewasa dan mengalami birahi pertama kali. Folikel tersier memiliki ruang yang disebut antrum folikuli. Ruang ini nantinya akan diisi cairan folikel (Partodihardjo, 1992). Folikel tersier memiliki diameter 0,25-10 mm (Adams and Singh, 2015).

Tahap terakhir atau tahap keempat terjadi hanya beberapa hari menjelang birahi dan tahap ini sering disebut sebagai tahap pematangan. Pada tahap ini folikel tersier akan berubah menjadi folikel de Graaf yang merupakan bentuk terakhir dan terbesar. Folikel de Graaf dilapisi oleh *theca interna* dan *theca externa* sedangkan sel telur terbungkus oleh kumulus ooporus (Partodihardjo, 1992). Folikel de Graaf memiliki diameter 10-15 mm (Adams and Singh, 2015).

2.5 Pematangan Oosit In Vitro (In Vitro Maturation)

Pematangan oosit diluar ovarium atau tubuh hewan disebut dengan pematangan oosit *in vitro* atau *In Vitro Maturation* (IVM) dan merupakan salah satu tahap penting dalam rangkaian produksi embrio *in vitro*. Oosit yang digunakan untuk produksi embrio dapat diperoleh dari ovarium hewan betina yang masih hidup maupun ovarium hewan betina yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH) dengan tanpa memperhatikan fase siklus birahi (Mutmainna, 2014).

Pematangan oosit *in vitro* merupakan pematangan oosit pada medium di luar tubuh dan dikultur secara *in vitro* untuk memperoleh oosit yang matang

dalam jumlah besar dengan dimatangkan dalam medium pematangan (Syamsudin, 2014). Lima faktor yang berpengaruh dalam keberhasilan pematangan oosit adalah morfologi kumulus, ukuran dan kondisi folikel, stimulasi ovarium dan prosedur maturasi oosit sejak sebelum diinkubasi (Sirard and Blondin, 1996).

Laju proses maturasi oosit sapi, domba, dan babi lambat karena membutuhkan waktu untuk melakukan sintesa protein untuk persiapan permulaan meiosis. Pada sapi proses maturasi inti secara *in vivo* membutuhkan waktu selama \pm 24 jam. Pada proses pematangan oosit *in vitro* dipengaruhi oleh medium pematangan dan lingkungan penyimpanan (Inkubator). Medium standard untuk pematangan *in vitro* oosit sapi adalah TCM-199. Agar menunjang keberhasilan proses maturasi *in vitro* dilakukan inovasi komposisi dan penambahan suplemen untuk mendapatkan kondisi medium yang optimal. Suplemen seperti serum, hormon estradiol, hormon gonadotropin (FSH dan LH), mineral, glukosa, piruvat dan asam amino ditambahkan untuk membantu transformasi inti (Sirard dan Blondin 1996).

Penentuan kualitas oosit dilakukan dengan melakukan beberapa evaluasi terhadap oosit. Seleksi oosit yang banyak digunakan adalah pemilihan oosit berdasarkan morfologi sel kumulus yang berada disekitar oosit (Alvarez *et al.*, 2009). Teknik *grading* dengan mengevaluasi sel-sel kumulus oosit yang kompleks dapat mengidentifikasi kualitas oosit yang lebih mudah dan objektif serta keberadaan sel kumulus mendukung pematangan oosit sampai pada tahap metafase II dan berkaitan dengan pematangan sitoplasma yang diperlukan untuk kemampuan perkembangan setelah fertilisasi (Abeydeera 2002).

Teknik pengambilan oosit dari folikel dapat dilakukan dengan cara teknik aspirasi dan teknik insisi. Dengan teknik aspirasi oosit, oosit dikeluarkan dengan cara aspirasi menggunakan spuit yang diisi dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan menggunakan jarum 18G sedangkan teknik insisi, folikel pada ovarium dirobek menggunakan skapel steril di dalam cawan petri kemudian ditambahkan larutan PBS (Karp, 2013).

2.6 Medium Kultur *In Vitro*

Medium yang digunakan dalam IVM tidak hanya berpengaruh pada proporsi pada oosit sapi yang mencapai metafase II (MII) tetapi juga berpengaruh pada perkembangan embrio setelah dilakukan fertilisasi (Bavister *et al.*, 1992). Medium sederhana umumnya mengandung sistem *buffer* bikarbonat yang berisi larutan saline fisiologis dasar seperti piruvat, laktat, dan glukosa. Perbedaan paling utama antar tipe variasi adalah pada konsentrasi ion dan konsentrasi sumber energi. Medium umumnya disuplementasi dengan serum atau albumin dengan penambahan antibiotika (penisilin, streptomisin, gentamisin) (Gordon, 2003)

Dalam rangkaian proses produksi embrio (maturasi, fertilisasi, dan kultur embrio) secara *in vitro*, dibutuhkan suatu lingkungan mikro yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi perkembangan pematangan oosit secara *in vitro* adalah pemilihan medium yang tepat. Medium umum yang digunakan dalam kegiatan maturasi *in vitro* adalah *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 dan Charles Rosenkrans

(CR)1aa. TCM-199 merupakan medium kompleks yang bersifat komersial dan telah digunakan untuk produksi embrio sapi, domba, babi dan manusia sedangkan CR1aa merupakan *semi defined medium* yang telah digunakan untuk oosit unta, oosit dan embrio kambing, embrio kucing, serta oosit dan embrio kerbau, (Boediono *et al*, 2006; Yunawati *et al*, 2006).

Proses *in vitro* harus memiliki empat komponen dasar dalam medium yaitu medium dasar, serum, aditif dan sistem penyangga. TCM-199 adalah suatu media yang bagus untuk maturasi oosit secara normal. Pemilihan TCM-199 ini sebagai medium dasar untuk maturasi *in vitro* karena bahan penyusun TCM-199 terdiri dari garam anorganik untuk mengatur osmolaritas medium, asam amino yang mendukung proses pematangan dan perkembangan sel oosit, vitamin, glukosa dan beberapa bahan lain yang mendukung proses pematangan inti oosit dan perkembangan embrio selanjutnya serta natrium bikarbonat yang akan mempertahankan derajat keasaman (pH) medium (Yunawati *et al*, 2006).

2.7 Insulin Transferrin Selenium (ITS)

Insulin Transferin Selenium (ITS) sebagai suplemen media yang kompleks dengan volume kecil mampu mempertahankan sintesa matriks ekstraseluler dan dipakai dalam kultur jangka panjang (Kisiday *et al.*, 2005). Dalam pengaturan stres oksidatif, suplementasi Insulin Transferin Selenium (ITS) mampu meminimalkan pengaruh negatif dari hidrogen peroksida (H_2O_2) yang memicu lingkungan oksidatif. Tiga komponen pada ITS yaitu insulin, transferin dan selenium bekerja bersama-sama dalam perbaikan sel memiliki fungsi yang

komplek dan saling berkaitan (Kurzawa *et al.*, 2002). ITS sering digunakan dalam kegiatan IVM pada oosit mencit, sapi dan kambing (Jeong *et al.*, 2008)

Insulin merupakan suatu polipeptida yang dapat meningkatkan uptake glukosa dan asam amino. Insulin dan IGF-1 (*Insulin like-Growth Factor-1*) dapat meningkatkan perkembangan oosit dan embrio pada saat IVM maupun IVC (*In Vitro Culture*) (Jeong *et al.*, 2008). Transferrin dan Selenium memiliki aktivitas yang sama seperti antioksidan yaitu menghambat pembentukan radikal bebas dengan memutus rantai pembentuk radikal hidroksil (OH⁻) maupun mengubahnya dalam bentuk yang lebih stabil (Winarsi, 2007; Ani, 2011).

2.8 Maturation Promoting Factor (MPF)

MPF (*Maturation Promoting Factor*), yang juga disebut *M-phase Promoting Factor* merupakan suatu protein heterodimerik yang terdiri atas ikatan kompleks dari Cyclin B 45-kDa dan Cyclin-Dependent Kinase (CDK1, atau disebut p34^{cdc2} Atau Cdc2) yang terlibat dalam siklus sel meiosis maupun mitosis. MPF bertanggung jawab atas transisi sel-sel dari fase G2 ke fase M dari siklus sel. Protein ini diaktifkan pada akhir fase G2 oleh enzim phosphatase. Kedua unit dari MPF ini bergabung untuk membentuk pre-MPF inaktif yang kemudian diaktifkan hanya setelah pengangkatan (pembuangan) fosfat dari tyrosine 15 Cdc2 yang diregulasi oleh protein tyrosine phosphatase khusus dan kinase yang homolog dengan produk-produk protein Cdc25 (Kong *et al.*, 2000; Schmitt and Nebreda, 2002).

Protein *cyclin* termasuk golongan protein yang ikut bekerja untuk perkembangan sel di dalam siklus sel. *Cyclin* sangat kompleks, berbentuk *Cyclin-Dependent Kinase* (CDK), yang mengaktivasi fungsi protein kinase. *Cyclin* diproduksi untuk mengantarkan sel ke dalam stadium yang berbeda pada siklus sel. Ketika konsentrasi *cyclin* dalam sel menurun, *cyclin* dilepaskan dari CDK, menghambat aktivitas enzim. *Cyclin B* adalah *mitotic cyclin*. Jumlah dari *cyclin B* (yang mengikat CDK) dan aktivitas dari *cyclin B*-CDK kompleks meningkat saat terjadi mitosis (Dekel, 2005; Fung and Poon, 2005; Mehlmann, 2005).

Kedua komponen dari MPF harus ada untuk maturasi meiosis, tapi mereka tidak disintesis secara bersamaan. Kadar *cyclin B* mencapai angka maksimal sebelum suatu sel mampu melakukan maturasi, walaupun teramati adanya variasi spesies, dan kadar Cdc2 tetap konstan, walaupun aktivitas MPF berubah (Hurk and Zhao, 2005).

2.9 Diameter

Oosit dapat diambil langsung dengan aspirasi dari folikel dengan diameter <2 mm akan mencapai metafase II dengan persentase yang rendah. Oosit dengan diameter 110-125 μm , memiliki kemampuan mencapai tahap MII lebih tinggi dan dapat dikoleksi dari folikel berukuran 3-4 dan > 4 mm (Ferreira *et al.*, 2009). Oosit dengan diameter <110 μm tidak dapat melakukan sintesis RNA maternal dan beberapa protein esensial dengan sempurna sehingga tidak dapat mencapai tahap MII (Otoi, *et al.*, 1997). Pada oosit kambing, kompetensi meiosis diperoleh ketika diameter oosit lebih besar dari 136 μm . Beberapa studi menyimpulkan

bahwa diameter oosit adalah berbanding lurus dengan diameter folikel, karena keduanya meningkatkan kemampuan perkembangan oosit pada sapi (Gandolfi, *et al.*, 1997).

Menurut Hyttel *et al.*, (1987) bahwa pada sapi oosit yang berdiameter 100 μm memiliki kemampuan untuk memulai meiosis dan oosit dengan diameter 110 μm memiliki kemampuan penuh untuk menyelesaikan pematangan dan untuk mempertahankan perkembangan embrio. Sesuai dengan klasifikasi diameter oosit menyimpulkan bahwa oosit sapi yang lebih besar dari 110 μm telah mencapai kemampuan meiosis, tetapi untuk memperoleh kemampuan perkembangan embrio harus memiliki diameter lebih besar dari 120 μm .

Kompetensi perkembangan oosit ke tahap selanjutnya sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan pada proses produksi embrio secara *in vitro*. Oosit yang berkualitas baik tidak hanya akan berhasil mencapai tahap pematangan inti namun juga akan mampu melewati berbagai tahap dalam pematangan sitoplasma yang dibutuhkan untuk dapat mencapai tahap fertilisasi. Kualitas oosit memberi pengaruh terhadap pematangan oosit, perkembangan dan kemampuan embrio untuk tetap bertahan hidup dan pemeliharaan pada kebuntingan dan perkembangan fetus (Krisher, *et al.*, 2007).

2.10 Pewarnaan Imunositokimia

Uji imunositokimia merupakan uji diagnosis yang spesifik dan saat ini telah berkembang pesat berkat adanya antibodi monoklonal dan dapat digunakan untuk berbagai penelitian. Imunositokimia digunakan pada sel sedangkan

imunohistokimia pada tingkat jaringan namun prinsip yang digunakan adalah sama (Wuryaningsih, 2007).

Pewarnaan imunostokimia yang pertama diaplikasikan pada jaringan formalin fiksatif dan paraffin embedding tahun 1974. Pada masa yang sam penggunaan antibodi monoclonal juga diperkenalkan. Sepuluh tahun kemudian prosedur jembatan peroksidase telah dikembangkan, diantaranya Guedson dengan teknik *Labelled Avidin-Biotin* (LAB) dan Hsu memperkenalkan teknik *Avidin Biotin Complex* (ABC). Teknik ini menggunakan avidin atau streptavidin yang berafinitas tinggi untuk biotin dan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik Peroksidase-anti Peroksidase (PAP) (Jasani and Schmidt, 1993).

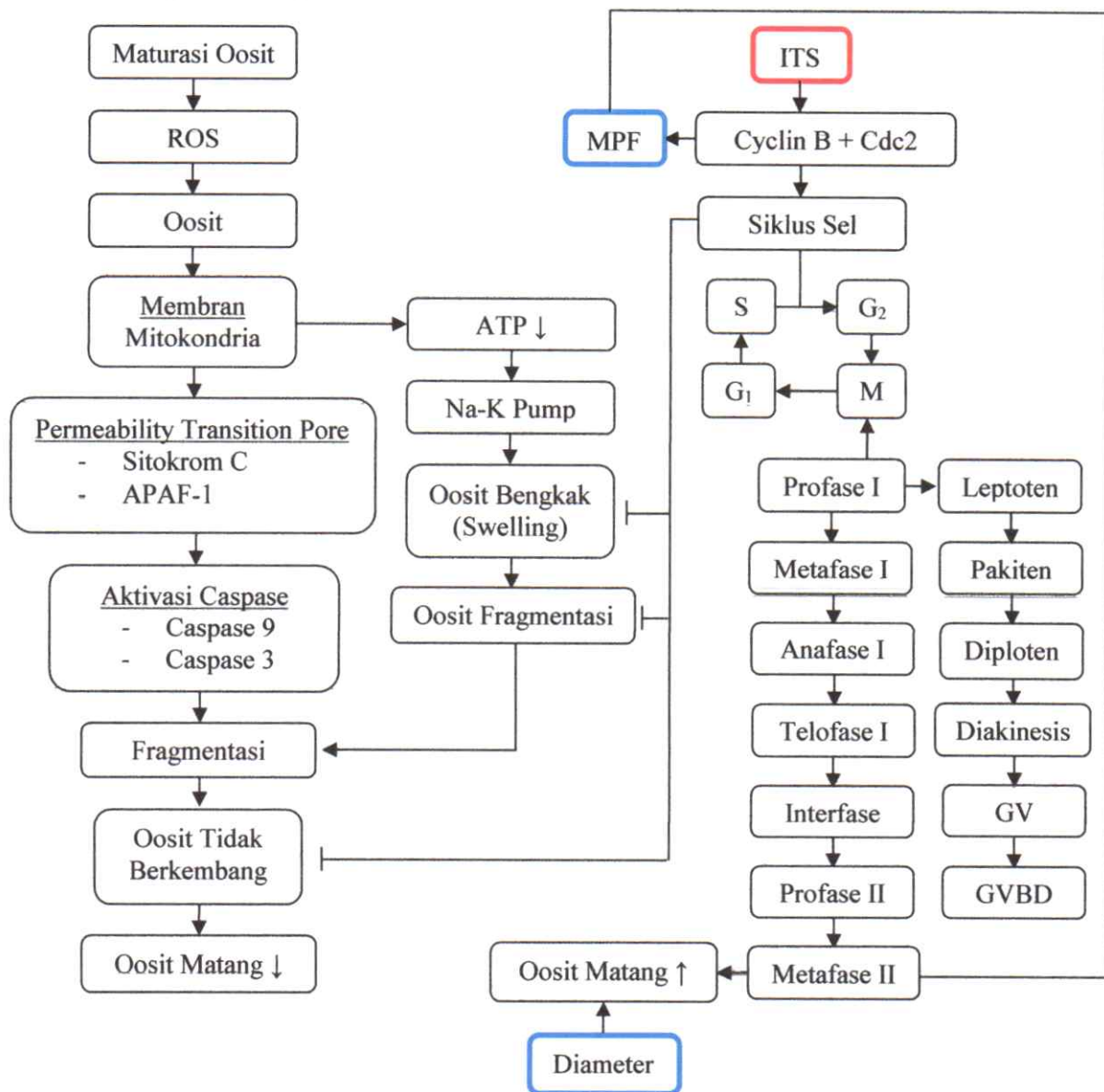
Teknik avidin biotin mengambil prinsip ikatan pada streptavidin atau avidin. Primer biotinylated atau antibodi kedua ditambahkan dalam objek dalam hal ini biasa jaringan atau sel. Langkah ini diikuti dengan memasukkan avidin. Kemudian enzim biotinylated, fluorochrome, atau *marker* elektron mikroskopik ditambahkan untuk melihat gambaran ekspresi ikatannya. Oleh karena itu antibodi atau lektin adalah “Jembatan” bagi avidin yang berfungsi sebagai penunjuk (*marker*) molekul berbiotin (Jasani and Schmidt, 1993).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

- : Jalur yang berhubungan
- | : Jalur yang dihambat
- : Variabel Tergantung
- : Variabel Bebas

Maturasi oosit meliputi maturasi inti dan sitoplasma. Selama maturasi oosit struktur kromatin dalam oosit immatur melewati proses suatu penyusunan morfologi yang dimulai pada profase meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase II (MII). Proses maturasi *in vitro* memungkinkan oosit terpapar oleh konsentrasi oksigen dan intensitas cahaya yang tinggi sehingga metabolisme sel berjalan dan pada akhirnya meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti superoksida anion (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Keberadaan gugus hidroksil mengakibatkan peroksidasi lipid pada membran sel. Permeabilitas membran sel yang terganggu mengakibatkan mitokondria ikut terganggu, sehingga PTP (*Permeability Transition Pore*) ikut terganggu. Sitokrom C terlepas menuju sitosol akibat rusaknya mitokondria yang menyebabkan oligomerisasi Apaf-1 ke apoptosom. Apoptosom direkrut dan mengaktifkan *Caspase 9* dan pada akhirnya mengaktifasi *Caspase 3* yang berakibat kematian sel. Sehingga dapat menghambat proses maturasi oosit. Untuk meningkatkan maturasi oosit secara *in vitro* dapat ditambahkan Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada medium maturasi (Gupta *et al.*, 2008; Lumongga, 2008).

ITS sebagai suplemen media kultur dalam maturasi *in vitro* dapat meminimalkan pengaruh senyawa radikal yang memicu lingkungan oksidatif. Tiga komponen yang dimiliki ITS adalah Insulin, Transferrin dan Selenium yang bekerja bersama dalam perbaikan sel dan saling berkaitan. Insulin yang terkandung dalam ITS merupakan stimulator dalam proliferasi seluler, diferensiasi sel, dan perkembangan sel. Disamping itu, dapat meningkatkan transport glukosa

dan uptake asam amino serta pertahanan sel akibat induksi insulin. Transferrin dan Selenium, yang terkandung dalam ITS, membantu dalam pertumbuhan sel menjadi lebih baik karena Transferrin berperan sebagai protein transport zat besi ke dalam sel serta dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel melalui proses detoksifikasi terhadap peroksidase dan radikal bebas dalam medium. Sedangkan sebagai komponen utama dari glutathione peroxidase, reduktase thioredoxin, dan enzim antioksidan lainnya yang akan bekerja menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara mengubahnya menjadi produk lain yang lebih stabil. Glutathione peroksidase dapat membentuk pertahanan terhadap radikal bebas di dalam sel dan mencegah kerusakan sel dengan cara mengkatalisa peroksida menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Jeong *et al.*, 2008; Winarsi, 2007).

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) dapat meningkatkan diameter oosit sapi yang dimaturasi *in vitro*.
2. Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada oosit sapi yang dimaturasi *in vitro* dapat meningkatkan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF).

BAB 4

METODE PENELITIAN

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan asumsi populasi sama dan memiliki kriteria yang homogen serta karakteristik sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena asumsi semua kelompok berasal dari satu populasi dan objek yang diteliti adalah oosit pada ovarium sapi yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH). Rancangan penelitian yang digunakan pada pelaksanaannya menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

4.2 Populasi dan Besar Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH). Selanjutnya dibawa ke Laboratorium In Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk dilakukan aspirasi, koleksi dan maturasi oosit.

4.2.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus federer (1963) dalam Kusrieningrum (2010):

$$t(n-1) \geq 15$$

Dengan : t = kelompok perlakuan dan n = jumlah sampel

Dengan rumus diatas, didapatkan jumlah ulangan 4,75 untuk 4 perlakuan, maka dibutuhkan jumlah sampel minimal 5 oosit yang belum matang pada tiap perlakuan dan secara keseluruhan membutuhkan 20 oosit yang belum matang. Namun dalam penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali ulangan dengan sampel 10 oosit pada setiap perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Insulin Transferrin Selenium (ITS) yang ditambahkan dalam medium maturasi dengan dosis 0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, dan 20 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2 Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)

Variabel tergantung adalah variabel akibat perlakuan dan yang akan diteliti dalam penelitian ini yaitu diameter oosit dan ekspresi *Maturation Promotion Factor* (MPF).

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah ovarium sapi, medium maturasi (TCM-199, BSA, Gentamisin, FSH, LH), suhu, kelembapan, dan lama maturasi.

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

1. Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) adalah suplemen kompleks yang terdiri dari Insulin, Transferrin, dan Selenium yang menunjang dalam keberhasilan proses maturasi dan berfungsi juga sebagai antioksidan pada proses maturasi oosit.
2. Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) adalah angka yang diperoleh dari skoring oosit yang telah dimaturasi berdasarkan intensitas warna kecoklatan setelah dilakukan pengecatan Imunositokimia.
3. Diameter oosit adalah ukuran diameter oosit dalam μm dengan menggunakan *software* ImageRaster 4.0.5 yang dikalibrasi dengan mikrometer objektif dengan perbesaran 100 kali.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil koleksi oosit dari ovarium sapi yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH), Insulin Transferrin Selenium (ITS), medium kultur *in vitro* (TCM-199, Sigma[®], St. Louis USA, M-2520), *mineral oil* (Sigma[®], St Louis USA, M-2520), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Bovine Serum Albumin* (BSA), Gentamisin (PT. Indofarma), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Folligon[®], Canada), *Luteinizing Hormon* (LH) (Choluron[®], Canada), Anti-Antibodi MPF (Bioss[®], USA), aquadest steril, kertas *tissue* steril, alkohol 70%, dan NaCl fisiologis.

4.5 Peralatan Penelitian

Peralatan penelitian yang digunakan antara lain jangka sorong, selang infus, inkubator CO₂ yang dilengkapi dengan pengatur suhu dan kelembapan, *inverted microscope*, *laminar air flow*, *disposable petridish* (Nunc®), Mikropipet, Yellow Tip, *beaker glass*, pinset, *disposable syringe*, gunting, filter *milipore*, dan jarum 18G.

4.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Koleksi oosit yang belum matang dari ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH), maturasi oosit *in vitro*, dan pengukuran diameter oosit dilakukan di Laboratorium In Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat Imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu Penelitian dari bulan Juli 2015 hingga bulan Agustus 2015.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Koleksi Oosit

1. Ovarium diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) disimpan didalam larutan yang mengandung NaCl fisiologis yang diberi tambahan gentamisin 5 ml/L kemudian dibawa menuju Laboratorium In Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Ovarium yang berasal dari RPH dicuci dengan NaCl fisiologis yang diberi Gentamisin beberapa kali pencucian hingga cairan pencuci menjadi jernih.

3. Oosit diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum 18G yang dihubungkan dengan spuit 10 ml dan berisi 3 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*).
4. Pengambilan sampel oosit berasal dari folikel dengan diameter permukaan folikel 2 – 6 mm, diukur dengan menggunakan jangka sorong. Sampel oosit yang belum matang dipilih kualitas A.
5. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium PBS dan dua kali di dalam TCM-199.

4.7.2 Maturasi Oosit

Untuk proses maturasi oosit digunakan medium TCM-199 yang ditambahkan FSH 100 IU/ml, LH 100 IU/ml, BSA 3% dan ITS (Insulin Transferrin Selenium). ITS yang digunakan untuk suplementasi dalam media kultur adalah 10 µg/ml, 15 µg/ml, dan 20 µg/ml. Setiap *petridish* berisi empat drop media maturasi 50 µg/ml yang telah dilapisi *mineral oil* kemudian diinkubasi pada inkubator pada suhu 38,5°C dengan CO₂ 5%, kelembapan 95% (Widjiati, 2011; Kusindarta, 2009) selama 22 jam. Kemudian dilakukan evaluasi untuk pengukuran diameter oosit dan identifikasi ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) dengan pewarnaan Imunositokimia.

- Kontrol (P₀) : 10 oosit + Medium maturasi
- Perlakuan 1 (P₁) : 10 oosit + Medium maturasi + ITS 10 µg/ml
- Perlakuan 2 (P₂) : 10 oosit + Medium maturasi + ITS 15 µg/ml
- Perlakuan 3 (P₃) : 10 oosit + Medium maturasi + ITS 20 µg/ml

4.7.3 Pengukuran diameter oosit

Metode pengukuran diameter oosit dibawah mikroskop kemudian dilakukan pengambilan gambar dibawah mikroskop dengan kamera OptiLab Plus 2.2 selanjutnya gambar dikalibrasi dengan mikrometer objektif untuk dilakukan pengukuran menggunakan *software* ImageRaster 4.0.5 (Lampiran 3). Pengukuran ini dilakukan pada oosit sebelum dilakukan maturasi dan sesudah maturasi *in vitro*. Diameter oosit dapat dihitung dengan cara:

$$D_s = \frac{(D_H + D_V)}{2}$$

Dengan:

D_s = Diameter Sebenarnya; D_H = Diameter Horizontal; dan D_V = Diameter Vertikal

4.7.4 Identifikasi Ekspresi Maturation Promoting Factor (MPF) dengan Metode Imunositokimia

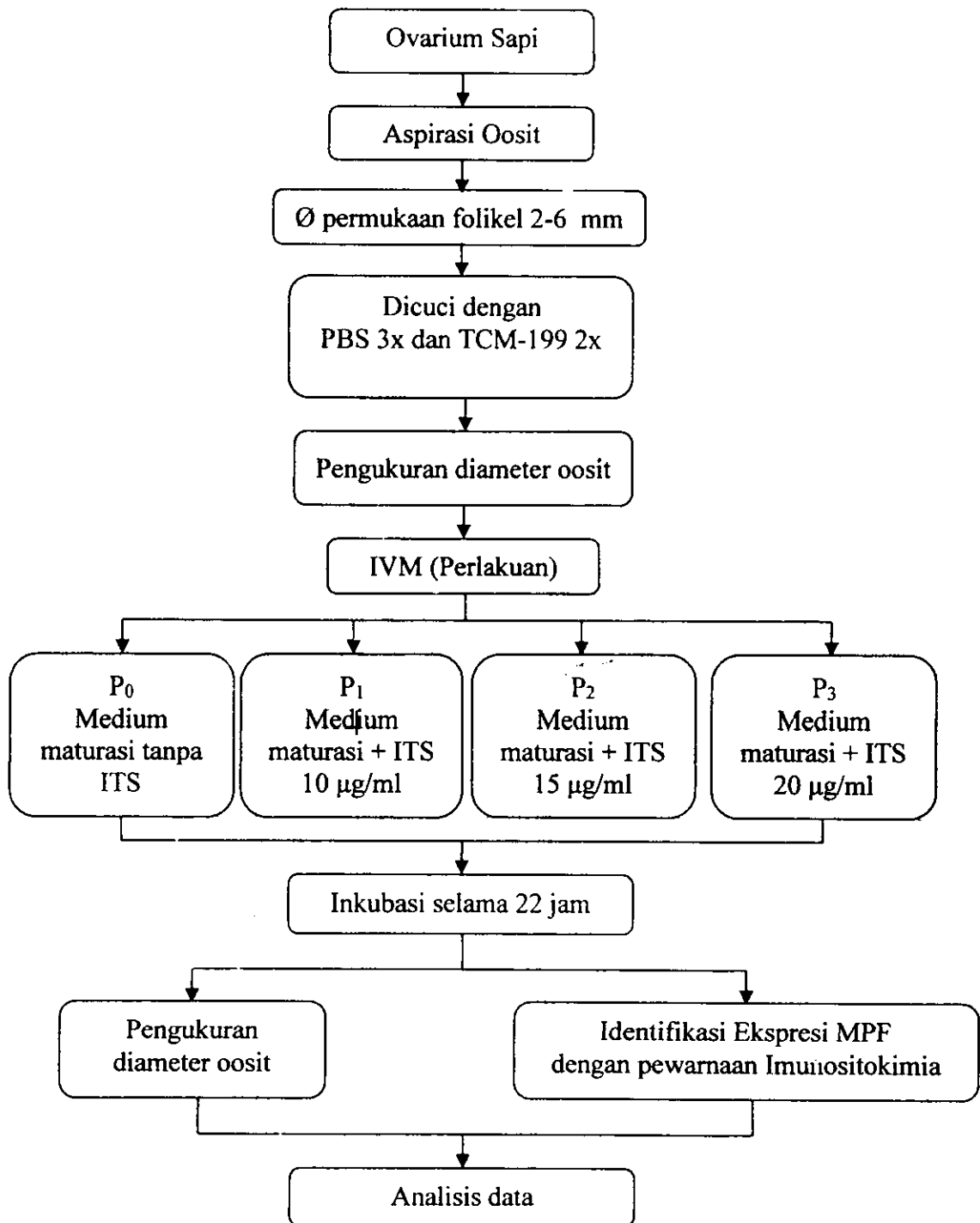
Oosit yang telah dimaturasi diletakkan pada gelas objek yang dilapisi *Poly-L Lysine* dan dikeringkan pada suhu ruangan, kemudian difiksasi ke dalam larutan fiksatif (*Acetic Acid Glacial*-Etanol Absolut, 1:3) kemudian dicuci kembali dengan PBS 10% yang ditambahkan krioprotektan dua kali selama 10 menit. H_2O_2 3% diteteaskan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan PBS 10%. Diinkubasi dengan menambahkan antibodi primer (Anti Antibodi MPF) yang diencerkan dengan diluents-Ab 5% selama 1 jam pada suhu ruang. Diinkubasi dengan antibodi sekunder biotinylated 1:600 dalam PBS 10% pada suhu ruang. Kemudian dicuci 10 kali selama 60 menit dalam PBS 10%. Diinkubasi dengan

streptavidin *fluorophore-conjugated* 1:200 dalam PBS 10% selama 2-3 jam pada suhu 37°C lalu dicuci 10 kali selama 60 menit dalam PBS. oosit diwarnai dengan *counter staining Methylene green* kemudian oosit ditutup dengan perekat dan ditutup dengan *cover glass*. Selanjutnya dikeringkan dan preparat dilihat dengan mikroskop dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali. Hasil yang positif akan terlihat warna kecoklatan (Hoffman *et al.*, 2008).

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara non parametrik dan analitik parametrik. Analisis non parametrik menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney sedangkan analisis analitik menggunakan *One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA)*. Analisis dilakukan dengan asumsi populasi yang diuji berdistribusi normal, homogen, dan sampel tidak berhubungan satu sama lain. Bila tidak berdistribusi normal akan dilakukan transformasi arc sin.

4.9 Kerangka Operasional Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 5 kali ulangan pada 4 perlakuan dengan jumlah sampel sebanyak 10 oosit tiap ulangan. Hasil penelitian suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada medium maturasi TCM-199 dengan berbagai perlakuan yaitu (P₀) kelompok kontrol tanpa penambahan ITS (0 µg/ml), (P₁) kelompok perlakuan dengan penambahan ITS 10 µg/ml, (P₂) kelompok perlakuan dengan penambahan ITS 15 µg/ml, dan (P₃) kelompok perlakuan dengan pemberian ITS 20 µg/ml yang dimatangkan selama 22 jam dalam inkubator pada suhu 38,5°C dengan CO₂ 5% dan kelembapan 95% terhadap diameter dan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) oosit sapi dapat diketahui pada penjelasan dibawah ini.

5.1 Data Pengukuran Diameter Oosit

Pengaruh Suplementasi ITS terhadap diameter oosit pada proses pematangan oosit *in vitro* dapat diketahui dengan cara melakukan pengukuran terhadap diameter oosit sebelum dan sesudah dilakukan pematangan dalam inkubator pada suhu 38,5°C dengan CO₂ 5% dan kelembapan 95% selama 22 jam.

Pengukuran diameter oosit dilakukan sebelum dan sesudah maturasi *in vitro* dengan cara mengukur panjang diameter vertikal dan horizontal menggunakan *software* ImageRaster 4.0.5 (Lampiran 3) kemudian rerata diameter diambil dari pengukuran diameter vertikal dan horizontal oosit sebagai diameter sebenarnya.

Sebelum Maturasi

Sesudah Maturasi



Gambar 5.1 Pengukuran Diameter Vertikal dan Horizontal Oosit Sapi Sebelum dan Sesudah Maturasi *in vitro* dengan *software* ImageRaster Pada Perbesaran 100X

Data hasil pengukuran diameter oosit sebelum dan sesudah maturasi *in vitro* dengan suplementasi ITS dengan dosis 0 $\mu\text{g/ml}$ (tanpa pemberian ITS), 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, dan 20 $\mu\text{g/ml}$ dapat dilihat selengkapnya pada lampiran 4.

Tabel 5.1 Pengaruh Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Media Maturasi TCM-199 Terhadap Diameter Oosit Sapi yang Dimaturasi *in vitro*

Perlakuan	SD \pm Mean (μm)	
	Sebelum Maturasi	Sesudah Maturasi
P ₀	6,05 ^a \pm 118,33	6,01 ^a \pm 119,10
P ₁	7,23 ^a \pm 117,47	7,19 ^a \pm 118,32
P ₂	6,27 ^a \pm 114,83	6,26 ^a \pm 115,88
P ₃	8,61 ^a \pm 118,41	8,51 ^a \pm 118,24

Keterangan: Superscript yang sama pada baris yang sama dan kolom berbeda menunjukkan tidak ada perbebedaan yang nyata ($p < 0,05$)

- P₀ : Tanpa penambahkan ITS pada media maturasi
 P₁ : Dengan penambahan ITS 10 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi
 P₂ : Dengan penambahan ITS 15 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi
 P₃ : Dengan penambahan ITS 20 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi

Hasil analisis perhitungan dilakukan dengan uji *One-way* ANOVA terhadap keseluruhan perlakuan pada hasil pengukuran terhadap diameter oosit sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*. Berdasarkan tabel 5.1 dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan (P₀, P₁, P₂, dan P₃).

5.2 Data Pengukuran Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF)

Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) pada setiap sampel oosit dinilai secara semikuantitatif menurut metode remmele (Novak *et al*, 2007). Indeks Skala Remmele (IRS) merupakan hasil perkalian antara skor presentase sel immunoreaktif (A) dengan skor intensitas warna yang dihasilkan pada sel (B). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 5.2 Skala Semikuantitatif IRS Merupakan Hasil Perkalian Antara Skor Prosentase Sel Positif (A) dengan Skor Intensitas Reaksi Warna (B).

A	B
Skor 0 : Tidak ada sel positif	Skor 0 : Tidak ada reaksi warna
Skor 1 : sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : sel positif antara 11-50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara 51-80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif lebih dari 80%	

Tabel 5.3 Pengaruh Supplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Media Maturasi TCM-199 Terhadap Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) Oosit Sapi yang Dimaturasi *in vitro*

UJI MANN WHITNEY		
KELOMPOK	PERLAKUAN	SIG
K	P1	,007*
	P2	,024*
	P3	,000*
P1	P2	1,000
	P3	,020*
P2	P3	,036*

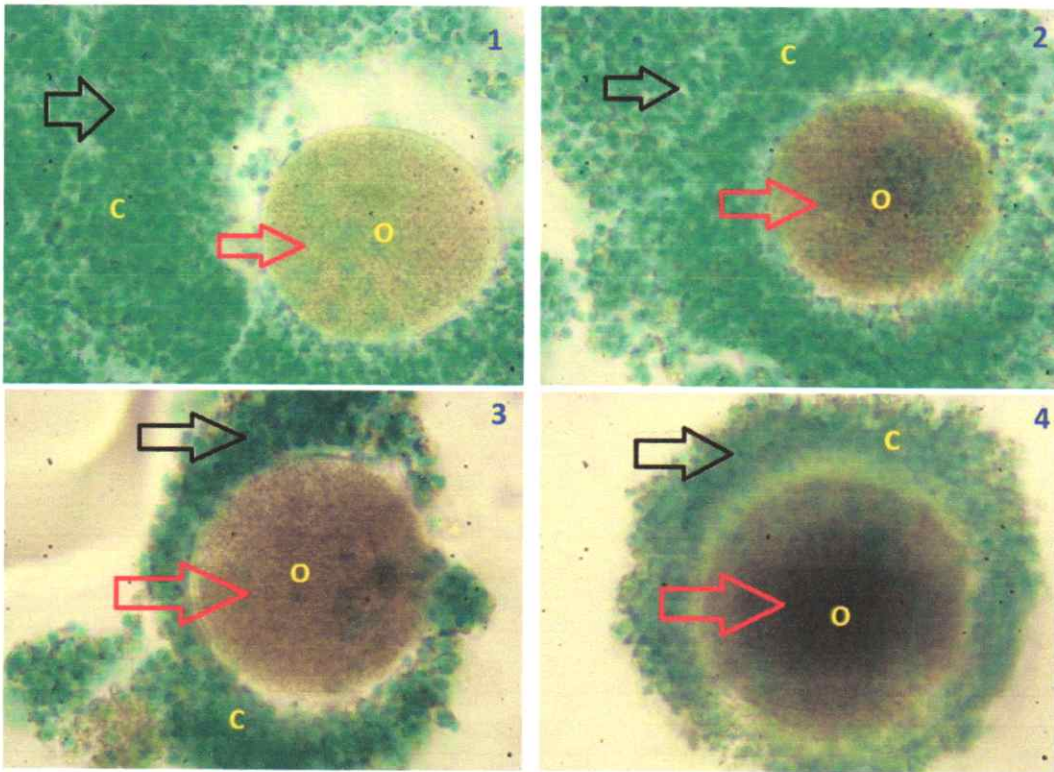
*Signifikan ($p < 0,05$)

Keterangan: P0 : Tanpa penambahan ITS pada media maturasi
P1 : Dengan penambahan ITS 10 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi
P2 : Dengan penambahan ITS 15 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi
P3 : Dengan penambahan ITS 20 $\mu\text{g/ml}$ pada media maturasi

Pengaruh suplementasi ITS pada proses pematangan oosit *in vitro* dapat diketahui melalui pewarnaan imunositokimia dengan metode *streptavidin biotin complex* terhadap oosit yang telah dilakukan pematangan yang diinkubasi pada inkubator pada suhu 38,5°C dengan CO₂ 5% dan kelembapan 95%.

Hasil analisis perhitungan dilakukan dengan uji Kruskal Wallis apabila terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk membandingkan antar perlakuan. Berdasarkan tabel 5.3 dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara P₀ (0 µg/ml) dengan P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), dan P₃ (20 µg/ml). Hal tersebut menunjukkan terdapat perbedaan antara medium maturasi TCM-199 tanpa suplementasi ITS dengan medium maturasi TCM-199 yang disuplementasi ITS dalam berbagai dosis (10 µg/ml, 15 µg/ml, dan 20 µg/ml).

Pada P₁ (10 µg/ml) dan P₂ (15 µg/ml) apabila dibandingkan maka tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) namun keduanya memiliki perbedaan yang nyata terhadap P₀ dan P₃ (20 µg/ml). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis suplementasi ITS pada medium maturasi TCM-199 tidak terdapat perbedaan pada dosis 10 µg/ml dan 15 µg/ml.



- Keterangan: → : Ekspresi MPF Pada Oosit (Warna Kecoklatan)
 → : *Counterstain Methylene Green* Pada Kumulus (Kehijauan)
 O : Oosit
 C : Cumulus
 1 : P₀ (Tanpa penambahan ITS pada media maturasi)
 2 : P₁ (Dengan penambahan ITS 10 µg/ml pada media maturasi)
 3 : P₂ (Dengan penambahan ITS 15 µg/ml pada media maturasi)
 4 : P₃ (Dengan penambahan ITS 20 µg/ml pada media maturasi)

Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Imunositokimia Pada Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) Pada Medium Maturasi TCM-199 Terhadap Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) Oosit Sapi yang Dimaturasi *in vitro* Pada Perbesaran 400X

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Diameter Oosit

Kompetensi perkembangan oosit ke tahap selanjutnya sangat dipengaruhi kualitas oosit yang digunakan pada proses produksi embrio secara *in vitro*. Oosit yang baik dapat mencapai tahap pematangan inti dan sitoplasma. (Krisher *et al.*, 2007). Diameter oosit sebagai salah satu faktor kualitas oosit, mempengaruhi kemampuan oosit untuk melakukan pematangan oosit. Oosit yang mempunyai diameter lebih besar akan mempunyai kemampuan yang lebih baik untuk mencapai meiosis I, oosit yang berasal dari folikel yang lebih besar mempunyai peluang yang lebih besar untuk mencapai metafase II dibanding oosit yang berasal dari folikel yang berdiameter lebih kecil. (Syamsudin, 2014).

Hasil analisis perhitungan dengan menggunakan uji *One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA)* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata antara P₀ (0 µg/ml) dengan P₁ (10 µg/ml), P₂ (15 µg/ml), dan P₃ (20 µg/ml). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) tidak dapat meningkatkan diameter oosit sapi yang dimaturasi *in vitro* selama 22 jam dengan inkubator CO₂ pada suhu 38,5°C, Kelembapan 95%, dan CO₂ 5%.

Diameter yang tidak mengalami peningkatan serta perbedaan yang tidak nyata secara statistik, menunjukkan bahwa suplementasi ITS pada media maturasi TCM-199 tidak berpengaruh terhadap diameter oosit sapi. Hal ini dikarenakan pada saat maturasi berlangsung, oosit hanya mengalami perubahan

materi seluler dan molekuler tanpa disertai dengan perubahan fisiologis seperti ukuran diameter yang dimiliki oosit.

Proses maturasi merupakan proses reinisiasi dan penyelesaian meiosis I hingga metafase II pada meiosis II dan perubahan materi genetik pada inti dan sitoplasma oosit agar siap untuk fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Saat maturasi oosit terjadi perubahan pada *nuclear envelope*, pembentukan kembali *cortical cytoskeleton*, dan pembentukan spindel (Greenstein, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa hanya terbatas pada perubahan secara molekuler dan seluler tanpa disertai perubahan fisiologis dari oosit.

Oosit akan terus bertumbuh setelah pembentukan antrum, yang melibatkan oosit yang berasal dari folikel berukuran 10-15 mm. Perbedaan diameter oosit yang berasal dari folikel besar dengan folikel kecil sekitar 5%. Perbedaan diameter oosit akan berpengaruh terhadap perkembangan oosit mulai perkembangan dini sampai blastosis (Arlotto *et al*, 1996). Pengaruh diameter oosit terhadap kemampuannya untuk berkembang berhubungan dengan lama pembentukan polar bodi pertama. Semakin cepat polar bodi pertama terbentuk (matang lebih awal) akan meningkatkan keberhasilan dalam pembentukan blastosis (Dominko dan First, 1992). Oosit yang matang lebih awal cenderung pada oosit yang memiliki diameter lebih besar (Arlotto, *et al.*, 1996). Oosit sapi memiliki diameter pada umumnya sebesar 110-120 μm . (Gandolfi *et al*, 1997). Dalam penelitian ini hampir semua oosit memiliki diameter yang seragam atau memiliki ukuran diameter ideal oosit untuk mencapai tahap pematangan.

Pengukuran diameter oosit harus dilakukan secara teliti dan hati-hati dikarenakan ukuran oosit yang sangat kecil (mikrometer atau μm) rentan terhadap kesalahan pengukuran. Disamping itu, faktor lain seperti kondisi fisik peneliti, terutama mata, menjadi faktor resiko kesalahan pengukuran tertinggi. Faktor lain seperti proses kalibrasi gambar dengan menggunakan mikrometer obyektif juga menjadi faktor penentu. Sebab, saat peneliti salah saat memasukkan nilai saat kalibrasi dan pembuatan skala maka pengukuran yang dihasilkan mengalami kesalahan pengukuran sehingga data yang dihasilkan tidak valid.

Penggunaan jumlah oosit dalam pengukuran diameter akan membuat data yang diperoleh melalui pengukuran menjadi representatif. Semakin banyak oosit yang diukur maka semakin banyak data yang diperoleh dan semakin representatif data yang disajikan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hipotesis awal tidak terbukti ($H_0 \neq H_1$) dan ini menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sesuai dengan landasan teoritis yang ada.

6.2 Ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF)

Faktor sitoplasmik pendorong maturasi atau *Maturation Promoting Factor* (MPF) dianggap sebagai faktor pemicu maturasi (Kakisina dan Indra, 2008). MPF yang terdiri dari subunit katalitik Cdc2 (CDK1) dan subunit cyclin-B bekerja secara paralel dengan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) dalam menjalankan progresi siklus meiosis oosit (Masui, 2001).

Maturasi oosit dimediasi oleh produksi MPF. Pada fase pre-MPF, MPF difosforilasi dalam Treonin (Thr) 161, sedangkan fosforilasi tirosin (Tyr) 15 dan Thr-14, yang dikatalisasi oleh protein kinase Wee1/Myt1, berfungsi menghambat aktivitas cdc2 yang mendorong akumulasi cdc2 berlebih sehingga senyawa cyclin-B inaktif pada fase S dan G2. Transisi dari fase G2 menuju fase M terjadi melalui aktivasi cdc2 dan cyclin-B sebagai hasil defosforilasi Thr-14 dan Tyr-15 oleh protein fosfat cdc25C atas bantuan Plk1 (Cooper and Hausman, 2006).

Proses maturasi *in vitro* memungkinkan oosit terpapar oleh konsentrasi Oksigen dan intensitas cahaya yang tinggi sehingga metabolisme sel berjalan sempurna dan pada akhirnya meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti superoksida anion (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\cdot), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Selama proses maturasi, Glutation (GSH) disintesis sebagai antioksidan endogen yang dapat menekan senyawa-senyawa radikal hasil metabolisme maupun senyawa radikal dari luar (Djuwita dkk., 2012).

Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada proses maturasi *in vitro* dapat menunjang keberhasilan proses maturasi oosit secara *in vitro* (Cordova *et al*, 2010). ITS sebagai suplemen media kultur dalam maturasi *in vitro* dapat meminimalkan pengaruh senyawa radikal yang memicu lingkungan oksidatif. Tiga komponen yang dimiliki ITS adalah Insulin, Transferrin dan Selenium yang bekerja bersama dalam perbaikan sel dan saling berkaitan (Kurzawa *et al*, 2002).

Insulin merupakan suatu polipeptida yang mengandung dua asam amino dan dihubungkan oleh jembatan disulfida. reseptor insulin dapat ditemukan pada berbagai sel, sehingga dengan pemberian insulinpu merangsang reseptor *Insulin*

Like-Growth Factor (IGF-1) pada membran sel. Hal ini dapat memicu proses fosforilasi dan aktivasi *Phosphatidylinositole 3-Kinase* (PI3K) (Ridwan dan Gotera, 2009). Aktivasi PI3K diikuti pula dengan aktivasi Protein Kinase B (PKB) atau dikenal dengan Akt, substrat utama dari PDK1 dan sebagai mediator insulin dalam berbagai aspek seperti transport glukosa, sintesis glikogen, pertumbuhan sel, dan pertahanan sel akibat induksi insulin. Akt memfosforilasi dan PDE-3 sehingga menyebabkan penurunan *cyclic* AMP-Protein Kinase A (cAMP-PKA) dan memicu aktivasi *polo-loke kinase* (Plk) yang pada akhirnya merangsang aktivasi cdc25C, sehingga terjadi Transisi G2-M (Andersen *et al*, 2003; Zick, 2004).

Transferrin dan Selenium, yang terkandung dalam ITS, membantu dalam pertumbuhan sel menjadi lebih baik karena Transferrin berperan sebagai protein transport zat besi ke dalam sel serta dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel melalui proses detoksifikasi terhadap peroksidase dan radikal bebas dalam medium (Djuwita dkk., 2012). Selenium sebagai komponen utama dari glutathione peroxidase, reduktase thioredoxin, dan enzim antioksidan lainnya yang akan bekerja menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara mengubahnya menjadi produk lain yang lebih stabil. Glutathione peroxidase dapat membentuk pertahanan terhadap radikal bebas di dalam sel dan mencegah kerusakan sel dengan cara mengkatalisa peroksida menjadi air (H₂O) dan oksigen (O₂) (Winarsi, 2007).

Kandungan Selenium dalam ITS dapat meningkatkan kadar GSH, yang berperan dalam pembebasan berbagai ROS yang dihasilkan selama penggunaan

oksigen untuk metabolisme aerobik sel. GSH dapat diregenerasi dari GSSG oleh enzim reductase glutathione (Luberda, 2005). Peningkatan konsentrasi HSH dalam medium maturasi dapat meningkatkan level glutathion intraseluler. Konsentrasi glutathione intraseluler pada proses pematangan oosit in-vitro mencerminkan tingkat pematangan sitoplasma dan suatu indikator dari pematangan sitoplasma (Hasbi dkk., 2012)

Hasil perhitungan uji Kruskal Wallis pada semua perlakuan bernilai berbeda nyata ($p < 0,05$) selanjutnya diuji kembali antar perlakuan dengan menggunakan uji Mann-Whitney. Hasil uji analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara P_0 ($0 \mu\text{g/ml}$) dengan P_1 ($10 \mu\text{g/ml}$), P_2 ($15 \mu\text{g/ml}$), dan P_3 ($20 \mu\text{g/ml}$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada media maturasi TCM-199 berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) dibandingkan dengan tanpa suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada media maturasi TCM-199.

P_1 ($10 \mu\text{g/ml}$) dan P_2 ($15 \mu\text{g/ml}$) apabila dibandingkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) namun keduanya memiliki perbedaan yang nyata terhadap P_0 dan P_3 ($20 \mu\text{g/ml}$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis suplementasi ITS pada medium maturasi TCM-199 tidak terdapat perbedaan pada dosis $10 \mu\text{g/ml}$ dan $15 \mu\text{g/ml}$ dalam meningkatkan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF).

Dosis $20 \mu\text{g/ml}$ pada suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) memberikan hasil yang terbaik. Secara statistik, P_3 ($20 \mu\text{g/ml}$) menunjukkan

perbedaan yang nyata dibandingkan dengan P₀, P₁ dan P₂. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa dengan dosis 20 µg/ml merupakan dosis yang terbaik untuk digunakan dalam proses pematangan oosit secara *in vitro*. Semakin gelap hasil ekspresi MPF pada oosit sapi hasil pewarnaan Imunositokimia menggunakan Anti-Antibodi MPF maka semakin tinggi aktivitas MPF yang terjadi pada oosit.

Prinsip pewarnaan Imunositokimia yang menggunakan prinsip ikatan Peroksidase-Anti Peroksidase (PAP) (Jasani and Schmidt, 1993) atau dalam penelitian ini menggunakan prinsip ikatan streptavidin-biotin memberikan hasil pewarnaan pada lokasi spesifik sesuai dengan tempat ekspresi protein yang dimiliki. Hal ini dapat diketahui dengan cara memberikan anti-antibodi spesifik serta chromogen pada saat pewarnaan sebagai *marker*. Penggunaan *Methyline Green* sebagai *Counterstain* pada pewarnaan imunositokimia sangatlah penting sebagai *marker* untuk membedakan daerah yang mengekspresikan protein dengan yang tidak.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hipotesis terbukti ($H_0 = H_1$). Pemberian Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada media maturasi TCM-199 dapat meningkatkan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada media maturasi TCM-199 tidak dapat meningkatkan diameter oosit sapi yang dimaturasi *in vitro*.
2. Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada media maturasi TCM-199 dapat meningkatkan ekspresi *Maturation Promoting Factor* (MPF) terutama pada dosis 20 µg/ml.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh suplementasi *insulin transferrin selenium* (ITS) pada proses IVM, IVF, dan IVC untuk mengetahui respon molekuler dan faktor-faktor lainnya yang dapat mempengaruhi kualitas oosit yang matang atau perkembangan embrio.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera, L.R. 2002. In Vitro Production of Embryos in Swine. *Theriogenology*. Elsevier Science Inc. 57: 257-273.
- Adams, G.P. and J. Singh. 2015. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In: R.M. Hooper (Ed). *Bovine Reproduction*. Wiley Blackwell. 219-244.
- Alvarez, G.M., G.C. Dalvit, M.V. Achi, M.S. Miguez, and P.D. Cetica. 2009. Immature Oocyte Quality and Maturation Competence of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes Subpopulations. *Biocell*. 33(3): 167-177.
- Andersen, C.B., H. Sakaue, T. Nedachi, K.S. Kovacina, C. Clayberger, M. Conti, and R.A. Roth. 2003. Protein Kinase B/Akt is Essential For The Insulin- but not Progesterone- Stimulated Resumption of Meiosis in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biochemistry*. 369: 227-238.
- Ani, L.S. 2011. *Metabolisme Zat Besi Pada Tubuh Manusia*. Widya Biologi. 2 (1): 1-9.
- Arlotto, T., J. L. Schwartz, and N. L. First. 1996. Aspect follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45: 943-956.
- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hellekant, and T. Pinyopummintr. 1992. Development of In Vitro Maturated/In Vitro Fertilized Bovine Embryos into Morulla and Blastocyst in Defined Culture Media. *Theriogenology*. 37: 127-146.
- Bhattacharya, S., D. Basu, N. Ak, and A. Priyadarshini. 2007. Molecular Mechanism of Oocyte Maturation [Abstract]. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. PubMed. 63: 45.
- Boediono, A. 2010. *Bioteknologi Embrio: Dari Ilmu Dasar Menuju Teknologi Modern*. Orasi Ilmiah Guru Besar Dalam Rangka Dies Natalies Institut Pertanian Bogor Ke-47. 2 Oktober 2010.
- Boediono, A., Yulinawati, dan M.A. Setiadi. 2006. Maturation Rate of Ovine Oocyte from Different Reproductive Status and Maturation Medium. *Hayati*. 13 (4): 131-136
- Bowles, C.M. and A.W. Lishman. 1998. Attempts to Improve The Yield of Bovine Blastocyst by Incorporating Insulin, Selenium, and Transferrin in The In Vitro System. *South African Journal of Animal Science*. 28 (1): 30-37.

- Bilodeau-Goeseels, S. and P. Panich. 2002. Effect of Oocyte Quality on Development and Transcriptional Activity in Early Bovine Embryos. *Animal Reproduction Science*. 143-155.
- Chotimah, C., M. Rahayu, G. Ciptadi, dan F. Fatchiyah. 2014. Optimization of Neuron Cells Maturation and Differentiation. *Jurnal Biotropika*. 2 (4): 191-197.
- Cooper, G.M. and R.E. Hausman. 2006. *The Cell: A Molecular Approach* 4th Edition. ASM Press. Sinauer Associates Inc. Washington DC.
- Cordova, B., R.Morato, D. Izquierdo, T. Paramio, and T. Mogas. 2010. Effect of the Addition of Insulin-Transferrin-Selenium and/or L-ascorbic Acid to the In-vitro Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes on Cytoplasmic Maturation and Embryo Development. *J. Theriogenologi* 74:1341-1348.
- Daoed, D.M., N. Ngadiyono, dan D.T. Widayati. 2013. Effect of Fetal Calf Serum Supplementation on In Vitro Maturation Ability of Bovine Oocytes. *Buletin Peternakan*. 37(3): 136-142.
- Dekel, N. 2005. Cellular, Biochemical and Molecular Mechanism Regulating Oocyte Maturation. *J. Mol and Cell Endocrin*. 234 : 19-25.
- Djuwita, I., Riyacumala, V., Mohamad, K., Prasetyaningtjas, WE., dan Nurhidayat. 2012. Pertumbuhan dan Sekresi Protein Hasil Kultur Primer Sel-sel Serebrum Anak Tikus. *Jurnal Veteriner*. 13(2):125-135.
- Dominko, T. and N. Fisrt. 1992. Kinetics of bovine oocyte maturation and is affected by gonadotropins. *Theriogenology*. 37:203-209.
- Ferreira, E.M., A.A. Vireque, P.R. Adona, F.V. Meirelles, R.A. Ferriani, and P.A. Navarro. 2009. Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes: Structural and Biochemical Modifications and Acquisition Of Developmental Competence. *Theriogenology*. 71:836-848
- Firmiatty, S., G. Ciptadi, S. Wahjuningsih, dan S. Suyadi. 2014. Effect of Insulin Transferin Selenium (ITS) on Oocyte Maturation In Vitro in Indonesian Goats. *Agriculture and Healthcare . Journal of Biology*. 4 (7): 113-117.
- Frandsen, R.D., W.L. Wilke, and A.D. Fails. 2009. *Anatomy and Physiology of Farm Animals* 7th Edition. Wiley Blackwell. John Wiley and Son Inc. United States.
- Fung, T.K. and R.Y.C. Poon. 2005. A Roller Coaster Ride With The Mitotic Cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 16 (3): 335-342.

- Gandolfi, F., A.M. Luciano, S. Modina, A. Ponzini, P. Pocar, D.T. Armstrong, and A. Lauria. 1997. The In Vitro Developmental Competence Of Bovine Oocytes Can Be Related To The Morphology Of The Ovary. *Theriogenology*. 48(7): 1153-1160.
- Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos 2nd Edition*. Biotechnology in Agriculture Series. CABI Publishing.
- Greenstein, D. 2005. Control of Oocyte Meiotic Maturation and Fertilization. *WormBook* ed. The C. Elegans Research Community. 1-12
- Gupta, S., Sekhon, L., and Agarwal, A. 2008. The Impact of Oxidative Stress on Female Reproduction and Art: An Evidence-Based Review. In: Makrigiannakis, A., Rizk, B., Valasco, JG., Sallam, H., eds. *Infertility and Assisted Reproduction*. Cambridge UP. 78-186.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. Chapter 2: Anatomy of Female Reproduction In: *Reproduction in Farm Animals 7th Edition*. Lippincott William and Wilkins. Philadelphia. 13-30.
- Hasbi, S. Gustina, M.A. Setiadi, dan I. Supriatna. 2012. Tingkat Pematangan Inti Oosit Domba dan Pembentukan Pronukleus Setelah Parthenogenesis dengan Penambahan Glutathione. *Jurnal Veteriner*. 13(4):445-452.
- Hoffman GE, WW Le, and LV Sita. 2008. The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical Methods. In *Current Protocols in Neuroscience*. Wiley Interscience. John Wiley and Sons. 1-26.
- Hurk, R. and J. Zhao. Formation of Mammalian Oocytes and Their Growth, Differentiation and Maturation Within Ovarian Follicles. *Theriogenology*. 63: 1717-1751.
- Hyttel, P., H. Callensen, and T. Greve, 1987. Ultra Structural Features of Preovulatory Oocytes Maturation in Superovulation Cattle. *Journal of Reproduction and Fertilization*. 76: 645-656.
- Hyttel, P., T. Fair, H. Callesen, and T. Greeve. 1997. Oocyte Growth, Capacitation, and Final Maturation in Cattle. *Theriogenology*. Elsevier Science Incorporation. 47: 23-32.
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, S.P. Madyawati, A. Samik, dan E. Safitri. 2010. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya
- Isnaeni W. 2006. *Fisiologi Hewan*. Kanisius Yogyakarta.

- Jasani, B. and K.W. Schmidt. 1993. Prostate Page: Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology. Medical Division of Langman Group UK Limited.
- Jeong, Y.W., M.S. Hossein, D.P. Bhandari, Y.W. Kim, J.H. Kim, S.W. Park, E. Lee, S.M. Park, Y.I. Jeong, J.Y. Lee, S. Kim, and W.S. Hwang. 2008. Effects of Insulin-Transferrin-Selenium in Defined and Porcine Follicular Fluid Supplemented IVM Media on Porcine IVF and SCNT Embryo Production. *Animal Reproduction Science*. 106: 13-24.
- Kakisina, P. dan R. Indra. 2008. Peran Leptin Terhadap Aktivitas Maturation Promoting Factor (MPF) Pada Maturasi Oosit. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 8 (1): 36-43.
- Karp, G. 2013. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments 7th Edition*. John Wiley And Sons Inc. United States of America.
- Kątska-Książkiewicz, L., J. Opiela, and B. Ryńska. 2007. Effect of Oocyte Quality, Semen Donor, and Embryo Co-Culture System on The Efficiency of Blastocyst Production in Goats. *Theriogenology*. Elsevier Incorporation. 68: 763-744.
- Kisiday, J.D., B. Kurz, M.A DiMicco, and A.J Grodzinsky. 2005. Evaluated of Medium Supplemented With Insulin-Transferrin-Selenium For Culture of Primary Bovine Calf Chondrocyte in Three-Dimensional Hydrogen Scaffolds. *Tissue Engineering*. 11 (2): 141-151.
- Kong, M., E.A. Barnes, V. Ollendorff, and D.J. Donoghue. 2000. Cyclin F Regulates The Nuclear Localization of Cyclin B1 Through A Cyclin-Cyclin Interaction. *EMBO J*. 19 (6): 1378-88.
- Krisher, R.L., A.M. Brad, J.R. Herrick, M.L. Sperman, And J.E. Swain. 2007. A Comparative Analysis Of Metabolisme And Viability In Porcine Oocytes During In Vitro Maturation. *Animal Reproduction Science*. 98: 72-96.
- Kurzawa, R., W. Głabowski, T. Bączkowski, and P. Brelik. 2002. Evaluation of Mouse Preimplantation Embryos Exposed to Oxidative Stress Cultured with Insulin-Like Growth Factor I and II, Epidemal Growth Factor, Insulin, Transferrin, and Selenium. *Reproductive Biology*. 2(2): 143-162
- Kusindarta, D.L. 2009. Pengaruh Lama Maturasi dan Lama Inkubasi Fertilisasi Terhadap Angka Fertilitas Oosit Sapi Peranakan Ongole Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 3(1): 185-193.
- Liu, X., J. Liu, N. Kang, L. Yan, Q. Wang, X. Fu, Y. Zang, R. Xiao, and Y. Cao. 2014. Role of Insulin-Transferrin-Selenium in Auricular Chondrocyte

- Proliferation and Engineered Cartilage Formation in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 1525-1537.
- Luberda, Z. 2005. The Role of Glutathione in Mammalian Gametes. *Reproductive Biology* 5(1): 5-17.
- Lumongga, F. 2008. Apoptosis. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. USU Repository
- Masui, Y. 2001. From Oocyte Maturation To The In Vitro Cell Cycle: The History of Discoveries of Maturation Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Diffentiation*. 69: 1-17.
- Mehlmann, L.M. 2005. Stop and Starts In Mammalian Oocytes: Recent Advances In Understanding The Regulation of Meiotic Arrest and Oocyte Maturation. *Journal of Reproduction and Fertilization*. 791-799.
- Mescher, A.L. 2013. *Junqueira's Basic Histology: Text And Atlas*. McGraw Hill Education. United States of America.
- Mutmainna, A. 2014. Potensi Oosit Berdasarkan Status Aktivitas Ovarium Untuk Mencapai Tingkat Kematangan Secara In Vitro Pada Sapi Bali [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanudin Makassar.
- Novak M, J.A. Madej and P. Dziegeil. 2007 Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. *Bull Vet inst Pulawy*. 51: 275-279.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa, and T. Suzuki. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*. 48: 769-774.
- Partodihardjo, S.1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta : Mutiara Sumber Widya.
- Ridwan M. dan W. Gotera. 2009. Pengaruh Insulin Terhadap Fungsi Kardiovaskular. *Jurnal Penyakit Dalam*. 10 (2): 148-155
- Schmitt, A. and Nebreda. 2002. Signalling Pathways In Oocyte Meiotic Maturation. *J. Cell Science*. 115: 2457-2459.
- Shen, P.C., S.N. Lee, B.T. Liu, F.H. Chu, C.H. Wang, J.S. Wu, H.H Lin, and W.T.K. Cheng. 2008. The Effect of Activation Treatments on The Development of Reconstructed Bovine Oocytes. *Animal Reproduction Science*. 106: 1-12.

- Sirard, M.A. and P. Blondin. 1996. Oocytes maturation and IVF cattle. *Animal Reproduction Science*. 42:417-426.
- Sobari, I., I.G.N.B. Trilaksana, dan I.K. Suatha. 2012. Perbedaan Aktivitas Ovarium Sapi Bali Kanan dan Kiri serta Morfologi Oosit yang Dikoleksi Menggunakan Metode Slicing. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1: 1-11.
- Soenardirahardjo, H.B.P., Widjiati, M. Mafruchati, dan E.M. Luqman. 2012. *Buku Ajar Embriologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Syamsudin, R. 2014. Pengaruh Diameter Oosit Sapi Bali Terhadap Tingkat Kematangan Inti Oosit Secara *In Vitro* [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Widayati, D.T. 2014. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Fakultas Peternakan. Universitas Gajah Mada. eLisa Universitas Gajah Mada. Jogjakarta.
- Widjiati, D. Wulansari, Wurlina, dan N.M.R Widjaja. 2011. Identifikasi Growth Differentiation Factor (GDF-9) Dari Maturasi *In Vitro* Oosit Sapi Dengan Teknik Imunositokimia. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 5(2): 59-62.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Wuryaningsih, Y.N.S. 2007. Deteksi Virus Den Pada Monosit Dengan Uji Streptavidin Biotin Untuk Diagnosis Dini Penyakit Demam Berdarah Dengue. *Biodiversitas*. 8 (3): 174-178.
- Yunawati, MA Setiadi, dan A Boediono. 2006. The Use of CR1aa for Ovine *In Vitro* Embryo Production. *JJTV*. 11 (2): 131-136
- Zick, Y. 2004. *The Insulin Signaling Network and Insulin Action in Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text 3rd Edition*. Lippincot Williams and Wilkins. 226-239.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. PERHITUNGAN BESAR SAMPEL

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

Oleh karena didapatkan jumlah ulangan 4,75 untuk 4 perlakuan makan dibutuhkan jumlah sampel 5 oosit pada tiap perlakuan.

LAMPIRAN 2. METODE PEWARNAAN IMUNOSITOKIMIA

- Sampel dibersihkan dari larutan fiksatif yang menempel pada gelas objek yang dilapisi *poly-L Lysine* menggunakan tisu secara perlahan dan hati hati
- Hidrogen peroksidase blok 5-10'
- Cuci PBS 2x5'
- Tripsin 15' (0,025%) dalam inkubator suhu 37°C
- Cuci PBS 2x5'
- Ultra V blok 5'
- Bilas dengan PBS lalu Ab
- Antibodi Primer (5% dengan diencerkan menggunakan diluent) 60'
- Cuci PBS 2x5'
- *Biotynilated link (Yellow)* drops 30'
- Cuci PBS 2x5'
- Streptavidin (*Red*) drops 30'
- Cuci PBS 2x5'
- DAB Chromogen diencerkan 2% dengan DAB plus substrat 6-10'
- Cuci PBS 2x5'
- Cuci Aquades 5'

COUNTERSTAIN:

- Methylene Green 5-10'

LAMPIRAN 3. PENGUKURAN PANJANG DIAMTER MENGGUNAKAN IMAGERASTER

- Menjalankan program ImageRaster
- Kalibrasi gambar sesuai perbesaran lensa objektif dengan menggunakan mikrometer objektif
- Pilih menu measure
- Pilih Lines untuk mengukur panjang atau diameter
- Tarik garis sesuai gambar yang akan diukur

Untuk menampilkan skala:

- Pilih menu scale
- Pilih enable scale
- Isi lenght sesuai dengan skala yang kita pakai
- Pilih position untuk memilih posisi skala yang ditampilkan

LAMPIRAN 4. HASIL PENGUKURAN DIAMETER OOSIT

PERLAKUAN	SEBELUM PEMATANGAN			SESUDAH PEMATANGAN			DIFF
	D _H	D _V	D _S	D _H	D _V	D _S	
P ₀	116,50	125,21	120,86	118,44	123,71	121,08	0,22
	126,69	128,02	127,36	124,93	124,93	127,44	0,08
	118,03	129,11	123,57	130,52	121,29	125,91	2,34
	110,43	119,75	115,09	112,48	118,82	115,65	0,56
	123,84	118,74	121,29	124,33	102,02	124,33	3,04
	113,22	110,78	112,00	112,78	111,95	112,37	0,37
	117,39	115,17	116,28	115,15	117,73	116,44	0,16
	112,92	115,74	114,33	114,46	117,16	115,86	1,53
	121,56	123,52	122,54	115,76	130,11	122,94	0,40
	112,54	123,37	117,96	109,49	126,73	118,11	0,15
	121,80	111,94	116,87	122,69	112,94	117,82	0,95
	117,63	118,54	118,09	118,03	118,94	118,49	0,40
	101,77	115,01	108,39	102,53	115,77	109,15	0,76
	114,56	141,12	127,84	115,10	141,66	128,38	0,54
	117,71	117,92	117,82	118,03	118,24	118,14	0,32
	115,78	121,05	118,42	116,64	121,91	119,28	0,86
	115,77	117,52	116,65	116,49	118,24	117,37	0,72
	114,08	117,24	115,66	114,18	119,24	116,71	1,05
	130,56	125,84	128,20	131,02	127,84	129,43	1,23
	109,30	114,75	112,03	111,30	116,75	114,03	2,00
	129,12	119,45	124,29	129,35	119,99	124,67	0,38
	127,15	137,91	132,53	127,51	138,23	132,87	0,34
	131,14	128,31	129,73	131,87	129,17	130,52	0,79
	113,27	124,17	118,72	113,97	124,90	119,44	0,72
	121,92	102,27	112,10	122,92	104,27	113,60	1,50
	120,49	117,37	118,93	120,85	117,73	119,29	0,36
	130,72	116,43	123,58	131,45	117,16	124,31	0,73
	108,34	117,07	112,71	110,34	117,77	114,06	1,35
	131,29	117,44	124,37	131,65	117,61	124,63	0,26
	105,52	115,18	110,35	106,25	115,39	110,82	0,47
	99,63	122,34	110,99	100,33	122,84	111,59	0,60
	118,07	105,38	111,73	118,24	105,70	111,97	0,24
	112,48	122,38	117,43	112,69	122,78	117,74	0,31
	127,76	102,46	115,11	128,26	103,22	115,74	0,63
	104,58	112,94	108,76	104,90	113,48	109,19	0,43
	123,93	135,37	129,65	124,93	135,69	130,31	0,66
	113,66	125,50	119,58	114,06	126,36	120,21	0,63
	123,87	133,46	128,67	124,63	134,18	129,41	0,74
	110,28	132,68	121,48	110,82	132,78	121,80	0,32
	111,27	133,83	122,55	111,59	134,29	122,94	0,39
	111,11	115,80	113,46	111,97	116,50	114,24	0,78

	117,02	126,38	121,70	117,74	126,69	122,22	0,52
	113,74	117,69	115,72	115,74	118,03	116,89	1,17
	107,19	110,28	108,74	109,19	110,43	109,81	1,07
	128,31	101,84	115,08	130,31	103,84	117,08	2,00
	121,77	112,25	117,01	122,77	112,48	117,63	0,62
	110,63	123,97	117,30	112,63	124,33	118,48	1,18
	111,36	112,05	111,71	112,35	112,78	112,57	0,86
	113,17	114,45	113,81	113,60	115,15	114,38	0,57
	120,13	114,29	117,21	121,13	114,46	117,80	0,59
P ₁	112,30	108,95	110,63	112,83	111,90	112,37	1,74
	120,18	96,31	108,25	109,41	112,48	110,95	2,70
	111,79	115,87	113,83	109,09	121,53	115,31	1,48
	112,94	112,75	112,44	119,94	105,02	112,48	0,04
	126,30	113,43	119,87	115,96	107,87	119,92	0,05
	111,12	109,75	110,44	102,55	118,94	110,75	0,31
	123,33	116,84	120,09	131,48	110,27	120,88	0,79
	112,83	115,01	127,57	123,39	133,67	128,53	0,96
	129,17	125,96	127,57	127,10	129,24	128,17	0,60
	122,08	113,48	117,78	117,65	118,79	118,22	0,44
	125,28	134,79	130,04	125,62	135,15	130,39	0,35
	122,35	121,18	121,77	122,50	121,91	122,21	0,44
	114,48	117,54	116,01	114,61	118,24	116,43	0,42
	114,43	116,24	115,34	114,66	119,24	116,95	1,61
	109,91	127,63	118,77	110,27	127,84	119,06	0,29
	104,71	116,25	110,48	106,71	116,75	111,73	1,25
	135,51	118,99	127,25	136,21	119,99	128,10	0,85
	119,76	137,34	128,55	119,93	138,23	129,08	0,53
	138,59	128,77	133,68	139,46	129,17	134,32	0,64
	108,59	124,14	116,37	109,29	124,90	117,10	0,73
	110,03	103,73	106,88	110,34	104,27	107,31	0,43
	129,65	103,38	116,52	131,65	103,70	117,68	1,16
	103,25	128,40	115,83	106,25	129,26	117,76	1,93
	98,33	119,31	108,82	100,33	119,74	110,04	1,22
	117,24	113,54	115,39	118,24	113,96	116,10	0,71
	112,33	111,81	112,07	112,69	112,48	112,59	0,52
	127,53	138,66	133,10	128,26	141,66	134,96	1,86
	102,90	127,88	115,39	104,90	128,09	116,50	1,11
	124,57	126,90	125,74	124,93	127,23	126,08	0,34
	109,38	105,03	107,21	110,11	109,03	109,57	2,36
	119,00	123,15	121,08	119,70	123,47	121,59	0,51
	113,66	122,60	118,13	113,83	123,49	118,66	0,53
	103,33	123,36	113,35	103,54	123,76	113,65	0,30
	110,25	108,48	109,37	110,75	109,24	110,00	0,63
	109,59	124,41	117,00	109,91	124,95	117,43	0,43
	103,95	126,80	115,38	104,95	127,12	116,04	0,66
	122,00	126,50	124,25	122,40	127,36	124,88	0,63

	127,24	129,52	128,38	128,00	130,24	129,12	0,74
	119,39	102,16	110,78	119,93	102,26	111,10	0,32
	103,94	104,11	104,03	104,26	104,57	104,42	0,39
	123,85	116,22	120,04	124,71	116,92	120,82	0,78
	110,06	119,02	114,54	110,78	119,33	115,06	0,52
	116,33	126,02	121,18	118,33	126,36	122,35	1,17
	106,09	134,03	120,06	108,09	134,18	121,14	1,08
	108,63	130,78	119,71	110,63	132,78	121,71	2,00
	102,11	134,06	118,09	103,11	134,29	118,70	0,61
	129,23	119,25	124,24	131,23	119,61	125,42	1,18
	106,15	109,75	107,95	107,14	110,48	108,81	0,86
	103,27	113,55	108,41	103,70	114,25	108,98	0,57
	101,55	126,21	113,88	102,55	126,38	114,47	0,59
P ₂	123,07	117,77	120,42	124,07	118,77	121,42	1,00
	118,83	117,61	118,22	119,83	119,61	119,72	1,50
	121,60	115,39	118,50	115,96	107,87	119,92	1,42
	127,57	122,84	125,21	127,04	127,78	127,41	2,20
	125,95	105,70	115,83	117,44	115,12	116,28	0,45
	127,40	122,78	125,09	126,21	124,93	125,34	0,25
	132,25	103,22	117,74	115,31	121,30	118,31	0,57
	119,04	113,48	116,26	117,40	117,78	117,59	1,33
	117,50	135,69	126,60	124,45	129,43	126,94	0,34
	151,12	122,52	136,82	140,07	134,53	137,30	0,48
	108,81	108,26	108,54	109,51	108,62	109,07	0,53
	122,83	116,64	119,74	123,78	117,37	120,58	0,84
	113,74	118,93	116,34	115,74	119,63	117,69	1,35
	107,53	105,31	106,42	108,03	105,48	106,76	0,34
	111,52	119,42	115,47	114,52	119,63	117,08	1,61
	115,10	116,87	115,99	116,00	117,37	116,69	0,70
	104,62	111,32	107,97	107,62	111,64	109,63	1,66
	112,72	99,19	105,96	113,53	100,08	106,81	0,85
	111,04	114,33	112,69	111,50	114,73	113,12	0,43
	108,19	115,00	111,60	108,89	115,76	112,33	0,73
	122,42	111,78	117,10	122,73	112,32	117,53	0,43
	120,77	119,17	119,97	122,77	119,49	121,13	1,16
	109,63	116,72	113,18	112,63	117,58	115,11	1,93
	113,85	107,09	110,47	115,85	107,52	111,69	1,22
	121,73	111,90	116,82	122,73	112,32	117,53	0,71
	122,41	118,82	120,62	122,77	119,49	121,13	0,51
	111,90	116,63	114,27	112,63	117,58	115,11	0,84
	113,85	107,31	110,58	115,85	107,52	111,69	1,11
	111,21	112,02	111,62	112,21	112,35	112,28	0,66
	105,31	112,85	109,08	109,31	113,60	111,46	2,38
	110,24	107,92	109,08	112,24	108,60	110,42	1,34
	107,45	110,60	109,03	110,45	110,92	110,69	1,66
	110,82	114,87	112,85	114,82	115,06	114,94	2,09

	119,78	120,39	120,09	121,78	121,13	121,46	1,37
	107,85	133,78	120,82	112,85	134,56	123,71	2,89
	113,83	121,28	117,56	115,83	121,78	118,81	1,25
	115,85	106,90	111,38	118,85	107,10	112,98	1,60
	107,29	111,68	109,49	109,29	112,00	110,65	1,16
	99,01	111,30	105,16	99,84	111,40	105,62	0,46
	104,48	110,03	107,26	106,48	110,49	108,49	1,23
	110,92	123,35	117,14	111,22	124,05	117,64	0,50
	113,67	113,78	113,73	114,39	114,09	114,24	0,51
	115,85	123,21	119,53	117,85	123,55	120,70	1,17
	104,91	102,74	103,83	106,91	102,89	104,90	1,07
	106,70	115,84	111,27	108,70	115,97	112,34	1,07
	112,60	113,37	112,99	113,60	113,60	113,60	0,61
	103,61	118,35	110,98	105,61	118,71	112,16	1,18
	125,09	115,45	120,27	126,08	116,18	121,13	0,86
	119,18	113,13	116,16	119,61	113,83	116,72	0,56
	101,26	113,90	107,58	102,26	114,07	108,17	0,59
P ₃	114,91	134,15	124,53	119,09	135,81	124,95	0,42
	126,26	124,88	125,57	127,18	128,57	127,88	2,31
	138,48	127,33	127,33	131,92	125,57	128,38	1,05
	124,93	125,75	125,34	123,42	128,17	125,79	0,45
	126,58	126,33	126,46	124,45	129,43	126,94	0,48
	113,34	130,58	121,96	110,32	138,41	124,37	2,41
	131,90	135,97	133,94	133,39	135,71	135,55	1,61
	101,33	123,42	112,38	120,29	109,46	114,88	2,50
	115,24	122,52	118,88	117,90	127,13	122,52	3,64
	120,00	145,96	132,98	130,13	136,52	133,33	0,35
	108,48	108,49	108,49	109,48	109,49	109,49	1,00
	105,50	119,99	112,75	111,53	117,83	114,68	1,93
	112,03	108,34	110,19	112,18	109,9	111,04	0,85
	100,62	100,39	100,51	100,62	102,39	101,51	1,00
	112,02	109,94	110,98	112,63	119,05	115,84	4,86
	114,14	117,58	115,86	114,14	117,58	115,86	0,00
	110,87	120,97	115,92	110,87	121,13	116,00	0,08
	119,15	119,54	119,35	119,15	120,80	119,98	0,63
	130,76	101,20	115,98	134,30	101,20	117,75	1,77
	102,76	108,14	105,45	102,53	109,14	105,84	0,39
	117,10	117,50	117,30	117,41	117,50	117,46	0,16
	123,86	117,50	120,68	125,86	117,50	121,68	1,00
	113,64	111,30	112,47	116,64	111,30	113,97	1,50
	114,49	129,35	121,92	116,49	129,35	122,92	1,00
	113,18	127,51	120,35	114,18	127,51	120,85	0,50
	130,66	131,87	131,27	131,02	131,87	131,45	0,18
	126,77	124,64	125,71	128,23	124,64	126,44	0,73
	137,18	133,80	135,49	139,18	133,80	136,49	1,00
	126,55	127,42	126,99	127,55	127,42	127,49	0,50

	117,24	127,61	122,43	121,24	127,61	124,43	2,00
	113,24	120,51	116,88	120,51	120,51	120,51	3,63
	129,08	131,62	130,35	132,08	132,08	132,08	1,73
	119,11	122,41	120,76	123,11	123,11	123,11	2,35
	116,33	118,02	117,18	118,33	118,33	118,33	1,15
	115,30	119,96	117,63	120,30	120,30	120,30	2,67
	121,23	123,08	122,16	123,23	123,23	123,23	1,07
	123,01	125,88	124,45	126,01	126,01	126,01	1,56
	111,05	112,82	111,94	113,05	113,05	113,05	1,11
	119,59	120,06	119,83	120,42	120,42	120,42	0,59
	114,95	116,22	115,59	116,95	116,95	116,95	1,36
	135,61	132,10	133,86	135,91	132,80	134,36	0,50
	119,98	125,71	122,85	120,70	125,88	123,29	0,44
	104,66	112,80	108,73	106,66	113,01	109,84	1,11
	106,09	107,59	106,84	108,09	108,09	108,09	1,25
	109,25	100,63	104,94	111,25	100,95	106,10	1,16
	110,29	115,53	112,91	111,29	116,41	113,85	0,94
	109,60	113,85	111,73	111,60	114,17	112,89	1,16
	120,27	109,11	114,69	121,26	109,56	115,41	0,72
	101,96	103,66	102,81	103,96	103,96	103,96	1,15
	109,44	100,44	104,94	110,44	103,44	106,94	2,00

Keterangan : P₀ : Tanpa penambahan ITS pada media maturasi
P₁ : Dengan penambahan ITS 10 µg/ml pada media maturasi
P₂ : Dengan penambahan ITS 15 µg/ml pada media maturasi
P₃ : Dengan penambahan ITS 20 µg/ml pada media maturasi
D_s : Diameter sebenarnya
D_H : Diameter horizontal
D_V : Diameter Vertikal
Diff : Selisih antara Rerata D_s sesudah dan sebelum pematangan

LAMPIRAN 5. HASIL EKSPRESI MPF

PERLAKUAN	SKOR PRESENTASE SEL POSITIF (A)	SKOR INTENSITAS REAKSI WARNA (B)	IRS
P ₀	1	2	2
	3	3	9
	2	1	2
	1	3	3
	1	3	3
	1	3	3
	2	2	4
	2	1	2
	3	1	3
	3	3	9
	2	2	4
	3	1	3
	2	3	6
	1	3	3
	2	1	2
	3	1	3
	3	1	3
3	1	3	
P ₁	3	3	9
	2	3	6
	3	3	9
	3	3	9
	3	2	6
	3	2	6
	3	4	12
	1	3	3
	1	3	3
	1	3	3
	2	2	4
	2	2	4
	3	3	9
	1	2	4
	3	1	3
	1	3	3
	3	2	6
3	1	3	
3	2	6	
1	3	3	

PERLAKUAN	SKOR PRESENTASE SEL POSITIF (A)	SKOR INTENSITAS REAKSI WARNA (B)	IRS
P ₂	1	3	3
	1	3	3
	3	2	6
	2	2	4
	1	2	2
	1	2	2
	3	3	9
	4	2	8
	3	3	9
	4	3	12
	3	3	9
	1	3	3
	1	3	3
	2	2	4
	3	1	3
	1	3	3
	4	2	8
	2	3	6
4	3	12	
3	3	9	
P ₃	4	3	12
	2	2	4
	1	2	3
	1	1	3
	3	3	9
	3	1	3
	2	3	6
	3	1	12
	4	3	12
	4	3	12
	2	2	4
	3	2	6
	4	3	12
	3	3	9
	3	1	12
	3	2	6
	4	2	8
	4	3	12
3	3	9	
3	3	9	

LAMPIRAN 6. UJI STATISTIK**HASIL PENGUKURAN DIAMETER OOSIT****Summarize****Case Processing Summary^a**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
P0 * Data	100	100,0%	0	0,0%	100	100,0%
P1 * Data	100	100,0%	0	0,0%	100	100,0%
P2 * Data	100	100,0%	0	0,0%	100	100,0%
P3 * Data	100	100,0%	0	0,0%	100	100,0%

a. Limited to first 200 cases.

Diameter Oosit^a

			P0	P1	P2	P3
Data	Sebelum	1	120,86	110,63	120,42	124,53
	Maturasi	2	127,36	108,25	118,22	125,57
		3	123,57	113,83	118,50	127,33
		4	115,09	112,44	125,21	125,34
		5	121,29	119,87	115,83	126,46
		6	112,00	110,44	125,09	121,96
		7	116,28	120,09	117,74	133,94
		8	114,33	127,57	116,26	112,38
		9	122,54	127,57	126,60	118,88
		10	117,96	117,78	136,82	132,98
		11	116,87	130,04	108,54	108,49
		12	118,09	121,77	119,74	112,75
		13	108,39	116,01	116,34	110,19
		14	127,84	115,34	106,42	100,51
		15	117,82	118,77	115,47	110,98
		16	118,42	110,48	115,99	115,86
		17	116,65	127,25	107,97	115,92
		18	115,66	128,55	105,96	119,35

19		128,20	133,68	112,69	115,98
20		112,03	116,37	111,60	105,45
21		124,29	106,88	117,10	117,30
22		132,53	116,52	119,97	120,68
23		129,73	115,83	113,18	112,47
24		118,72	108,82	110,47	121,92
25		112,10	115,39	116,82	120,35
26		118,93	112,07	120,62	131,27
27		123,58	133,10	114,27	125,71
28		112,71	115,39	110,58	135,49
29		124,37	125,74	111,62	126,99
30		110,35	107,21	109,08	122,43
31		110,99	121,08	109,08	116,88
32		111,73	118,13	109,03	130,35
33		117,43	113,35	112,85	120,76
34		115,11	109,37	120,09	117,18
35		108,76	117,00	120,82	117,63
36		129,65	115,38	117,56	122,16
37		119,58	124,25	111,38	124,45
38		128,67	128,38	109,49	111,94
39		121,48	110,78	105,16	119,83
40		122,55	104,03	107,26	115,59
41		113,46	120,04	117,14	133,86
42		121,70	114,54	113,73	122,85
43		115,72	121,18	119,53	108,73
44		108,74	120,06	103,83	106,84
45		115,08	119,71	111,27	104,94
46		117,01	118,09	112,99	112,91
47		117,30	124,24	110,98	111,73
48		111,71	107,95	120,27	114,69
49		113,81	108,41	116,16	102,81
50		117,21	113,88	107,58	104,94
Total	N	50	50	50	50
	Grouped	117,3650	116,4450	114,8700	118,2550
	Median				

		Std. Deviation	6,05179	7,23155	6,27896	8,61729
Sesudah	1		121,08	112,37	121,42	124,95
Maturasi	2		127,44	110,95	119,72	127,88
	3		125,91	115,31	119,92	128,38
	4		115,65	112,48	127,41	125,79
	5		124,33	119,92	116,28	126,94
	6		112,37	110,75	125,34	124,37
	7		116,44	120,88	118,31	135,55
	8		115,86	128,53	117,59	114,88
	9		122,94	128,17	126,94	122,52
	10		118,11	118,22	137,30	133,33
	11		117,82	130,39	109,07	109,49
	12		118,49	122,21	120,58	114,68
	13		109,15	116,43	117,69	111,04
	14		128,38	116,95	106,76	101,51
	15		118,14	119,06	117,08	115,84
	16		119,28	111,73	116,69	115,86
	17		117,37	128,10	109,63	116,00
	18		116,71	129,08	106,81	119,98
	19		129,43	134,32	113,12	117,75
	20		114,03	117,10	112,33	105,84
	21		124,67	107,31	117,53	117,46
	22		132,87	117,68	121,13	121,68
	23		130,52	117,76	115,11	113,97
	24		119,44	110,04	111,69	122,92
	25		113,60	116,10	117,53	120,85
	26		119,29	112,59	121,13	131,45
	27		124,31	134,96	115,11	126,44
	28		114,06	116,50	111,69	136,49
	29		124,63	126,08	112,28	127,49
	30		110,82	109,57	111,46	124,43
	31		111,59	121,59	110,42	120,51
	32		111,97	118,66	110,69	132,08
	33		117,74	113,65	114,94	123,11

34			115,74	110,00	121,46	118,33
35			109,19	117,43	123,71	120,30
36			130,31	116,04	118,81	123,23
37			120,21	124,88	112,98	126,01
38			129,41	129,12	110,65	113,05
39			121,80	111,10	105,62	120,42
40			122,94	104,42	108,49	116,95
41			114,24	120,82	117,64	134,36
42			122,22	115,06	114,24	123,29
43			116,89	122,35	120,70	109,84
44			109,81	121,14	104,90	108,09
45			117,08	121,71	112,34	106,10
46			117,63	118,70	113,60	113,85
47			118,48	125,42	112,16	112,89
48			112,57	108,81	121,13	115,41
49			114,38	108,98	116,72	103,96
50			117,80	114,47	108,17	106,94
Total	N		50	50	50	50
	Grouped Median		117,9650	117,5550	115,8900	120,3600
	Std. Deviation		6,01297	7,19047	6,26850	8,51477
Total	N		100	100	100	100
	Grouped Median		117,8067	117,0500	115,3500	119,5900
	Std. Deviation		6,01458	7,18714	6,26440	8,54701

a. Limited to first 200 cases.

Oneway

a. Unless otherwise noted, bootstrap results are based on 200 bootstrap samples

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
P0	,002	1	98	,965
P1	,009	1	98	,925
P2	,002	1	98	,962
P3	,007	1	98	,933

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
P0	Between Groups	15,124	1	15,124	,416	,521
	Within Groups	3566,217	98	36,390		
	Total	3581,342	99			
P1	Between Groups	17,944	1	17,944	,345	,558
	Within Groups	5095,907	98	51,999		
	Total	5113,850	99			
P2	Between Groups	27,773	1	27,773	,706	,403
	Within Groups	3857,250	98	39,360		
	Total	3885,023	99			
P3	Between Groups	40,896	1	40,896	,557	,457
	Within Groups	7191,190	98	73,379		
	Total	7232,086	99			

HASIL UJI IMUNOSITOKIMIA

Summarize

Case Processing Summary*

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IRS * Perlakuan	80	100,0%	0	0,0%	80	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Uji Immunositokimia*

			IRS
Perlakuan	P0	1	2,00
		2	9,00
		3	2,00
		4	3,00
		5	3,00
		6	3,00
		7	4,00

	8	2,00
	9	3,00
	10	9,00
	11	4,00
	12	3,00
	13	6,00
	14	3,00
	15	2,00
	16	3,00
	17	3,00
	18	3,00
	19	3,00
	20	3,00
	Total	N 20
		Mean 3,6500
		Std. Deviation 2,03328
P1	1	9,00
	2	6,00
	3	9,00
	4	9,00
	5	6,00
	6	6,00
	7	12,00
	8	3,00
	9	3,00
	10	3,00
	11	4,00
	12	4,00
	13	9,00
	14	4,00
	15	3,00
	16	3,00
	17	6,00
	18	3,00
	19	6,00

	20		3,00
	Total	N	20
		Mean	5,5500
		Std. Deviation	2,74293
P2	1		3,00
	2		3,00
	3		6,00
	4		4,00
	5		2,00
	6		2,00
	7		9,00
	8		8,00
	9		9,00
	10		12,00
	11		9,00
	12		3,00
	13		3,00
	14		4,00
	15		3,00
	16		3,00
	17		8,00
	18		6,00
	19		12,00
	20		9,00
	Total	N	20
		Mean	5,9000
		Std. Deviation	3,32297
P3	1		12,00
	2		4,00
	3		3,00
	4		3,00
	5		9,00
	6		3,00
	7		6,00
	8		12,00

9		12,00
10		12,00
11		4,00
12		6,00
13		12,00
14		9,00
15		12,00
16		6,00
17		8,00
18		12,00
19		9,00
20		9,00
Total	N	20
	Mean	8,1500
	Std. Deviation	3,51351
Total	N	80
	Mean	5,8125
	Std. Deviation	3,31889

a. Limited to first 100 cases.

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
IRS	P0	20	24,25
	P1	20	41,18
	P2	20	40,70
	P3	20	55,88
	Total	80	

Test Statistics^{a,b}

	IRS
Chi-Square	19,532
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P0	20	15,60	312,00
	P1	20	25,40	508,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	102,000
Wilcoxon W	312,000
Z	-2,795
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P0	20	16,50	330,00
	P2	20	24,50	490,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	120,000
Wilcoxon W	330,000
Z	-2,262
Asymp. Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,030 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P0	20	13,15	263,00
	P3	20	27,85	557,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	53,000
Wilcoxon W	263,000
Z	-4,088
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P1	20	20,50	410,00
	P2	20	20,50	410,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	200,000
Wilcoxon W	410,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P1	20	16,28	325,50
	P3	20	24,73	494,50
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	115,500
Wilcoxon W	325,500
Z	-2,334
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,021 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IRS	P2	20	16,70	334,00
	P3	20	24,30	486,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	IRS
Mann-Whitney U	124,000
Wilcoxon W	334,000
Z	-2,091
Asymp. Sig. (2-tailed)	,036
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,040 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.