



LAPORAN RISET FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2008

**PERAN KUMULUS DALAM MEKANISME
TRANSFORMING GROWTH FACTOR β DAN KEJADIAN APOTOSIS
TERHADAP TINGKAT KEMATANGAN OOSIT SAPI *IN VITRO***

OLEH :

Dr.drh. Widjiati, M.Si.

drh Rimayanti, M.Kes.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008.
Tanggal 5 Maret 2008

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

JANUARI, 2009



LAPORAN RISET FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2008

**PERAN KUMULUS DALAM MEKANISME
TRANSFORMING GROWTH FACTOR β DAN KEJADIAN APOTOSIS
TERHADAP TINGKAT KEMATANGAN OOSIT SAPI *IN VITRO***

OLEH :

Dr.drh. Widjiati, M.Si.

drh Rimayanti, M.Kes.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan
Nasional Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian
kepada Masyarakat Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008.

Tanggal 5 Maret 2008

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

JANUARI, 2009

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian : **Peran Kumulus Dalam Mekanisme Transforming Growth Factor B Dan Kejadian Apotosis Terhadap Tingkat Kematangan Oosit Sapi In Vitro**

2. Ketua Penelitian : Dr. Widjiati, MSi.,drh.
 a. Nama Lengkap : Perempuan
 b. Jenis Kelamin : Pembina / Gol. IVA / 131 877 882
 c. Pangkat/Gol. Dan NIP : Staf Pengajar
 d. Jabatan Sekarang : Ked. Hewan/ Reproduksi
 e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Universitas Airlangga
 f. Univ./Inst/Akademi/ : Biologi Reproduksi
 g. Bidang Ilmu : 2 (dua) orang

3. Jumlah Tim Peneliti

No	Nama dan Gelar	Instansi	Keahlian
1	Dr. Widjiati,MSi.,drh	FKH Unair	Biologi Reproduksi
2	Drh Rimayanti,MKes	FKH Unair	Biologi Reproduksi

4. Lokasi Penelitian : Lab. Fertilisasi in vitro dan Patologi Fak. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
 5. Jangka Waktu Penelitian : 7 (tujuh) bulan
 6. Biaya yang diperlukan : Rp. 25. 000.000,- (Dua Puluh Lima Juta Rupiah)

Surabaya, 6 Januari 2009

Kepala Peneliti

Mengetahui,
 Dekan
 Fakultas Kedokteran Hewan
 Universitas Airlangga



(Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh)
 NIP. 130 687 305

[Signature]
 Dr. Widjiati, MSi., d
 NIP. 131 877 882



Kepala Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat
 Universitas Airlangga
 (Prof. Dr. Bambang Sektiari L.DEA., Drh)
 NIP 131 837 004

dihasilkan secara *in vitro*. Selain itu penelitian ini bisa mendukung penelitian tentang produksi embrio *in vitro* sebagai bank embrio dalam rangka keperluan *transfer embrio*.

Metode penelitian ini oosit dikoleksi dari folikel yang ukuran diameter permukaan 3-5mm dan > 5 mm. Selanjutnya oosit dimaturasi dalam medium TCM 199 yang ditambah 5 µg / mg LH, 3 % BSA 50 µg / ml gentamycin sulfat dan suplementasi TGFβ dosis 12,85 pg, 25,7 pg dan 38,55 pg, kemudian oosit dikultur selama 22 jam pada suhu 38,5⁰ C dalam inkubator 5 % CO₂. Selanjutnya diperiksa tingkat kematangan oosit dan jumlah oositl yang mengalami apoptosis.

Hasil penelitian menunjukkan Tingkat kematangan oosit yang disuplementasi dengan *Transforming Growth Factor β* 38,55 pg lebih baik dibandingkan dengan dosis 12,85 pg dan 25,7 pg terlihat pada oosit yang mencapai tahap metafase II.. Suplementasi TGF β selama maturasi oosit *in vitro* tidak menyebabkan apoptosis sel.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini suplementasi *Transforming Growth Factor β* dosis 38,55 pg mampu meningkatkan kematangan oosit yang dimaturasi secara *in vitro* dan tidak menyebabkan apoptosis sel.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga : No.SKRektor 436/JO3.2/PG/2008, No.Kontrak 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008., Tahun Anggaran 2008)

SUMMARY

The cause of low productivity to in vitro embryo at blastosis level is the result of impervert oosit maturation. Unoptimal maturation in vitro causes impervert oosit growth, and finally affect embryo growth. During maturation process, besides hormonal role, growth factor role is quite significant. Mostly growth factor has role during maturation process, such as transforming growth factor β which is very significant to the process.

The purpose of the research is bearing transforming growth factor β which is isolated from oosit with kumulus complex to the necessity of co culture and embryo in vitro production. Meanwhile, the main idea of the research is proving supplementary correlation between TGF β and oosit maturation, also identify apoptosis cells after maturation process of in vitro. So we could resolve the cause of oosit degeneration.

The benefit of the research is getting to know at the role of TGF β will occur apoptosis cell mechanism, and it would lead to predict the produced oosit quality by in vitro. Further more, the research could support any research of embryo in vitro production, as embryo store in necessity of embryo transferring.

The research method by collecting oosit from folikel which has 3-5 mm and > 5 mm diameter of surface. Then the oosit is maturated at medium TCM 199 which is added 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LH, 3%B \bar{S} A 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin sulfat and supplementation TGF β by dose of 12,85 pg, 25,7 pg and 38,55 pg. Then the oosit is cultured for 22 hours at 38,5^o celcius degree under 5% CO₂ incubator. Then analyze oosit maturation and number of apoptosis cells,

The result of research shows oosit maturation which is supplemented by transforming growth factor β 38,55 dose, produced better than 12,85 or 25,7 pg dose. It could be seen at metavase II level of oosit. Oosit maturation doesn't cause apoptosis cell.

The possible conclusion of the research is supplementation transforming growth factor β at 38,55 pg dose can increase oosit maturation by in vitro and it doesn't cause apoptosis cell.

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kegiatan penelitian dengan judul “**Peran Kumulus Dalam Mekanisme *Transforming Growth Factor B* Dan Kejadian Apoptosis Terhadap Tingkat Kematangan Oosit Sapi *In Vitro***” dapat kami selesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat dilaksanakan atas pembiayaan dari dana Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Tahun Anggaran 2008. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi, selaku pemberi dana pada penelitian Riset Fundamental tahun anggaran 2008 dengan sumber dana DP2M .
2. Rektor Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penelitian memperoleh penelitian dari sumber dana DP2M.
3. Prof. Dr. Bambang Sektiari L.DEA.,drh., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
4. Prof.Hj. Romziah Sidik, Ph.D,drh, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
5. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Akhirnya, diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan penelitian khususnya di bidang antifertilitas pria.

Surabaya, Januari 2009

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PEGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY.....	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Perkembangan Sel Telur	5
2.2. Pematangan Oosit Secara <i>In Vitro</i>	6
2.3. Seleksi Ukuran Folikel	9
2.4. Tinjauan Tentang <i>Transforming Growth Factor</i> β	10
2.5. Ekspresi <i>Transforming Growth Factor</i> Pada Proses <i>Maturasi</i> Oosit	12
2.6. Tinjauan Tentang Apoptosis.....	14
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
3.1. Tujuan Penelitian	15
3.1.1. Tujuan Umum	15
3.1.2. Tujuan Khusus	15
3.2. Manfaat Penelitian	15

BAB IV	METODE PENELITIAN	16
	4.1. Sampel Penelitian	16
	4.2. Alat Penelitian	16
	4.3. Variabel Penelitian	16
	4.4. Lokasi Penelitian	17
	4.5. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian	18
	4.6. Analisa Data	19
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	20
	5.1. Suplementasi TGF β Tingkat Kematangan Oosit	20
	5.2. Tingkat Apoptosis Oosit Setelah Maturasi <i>In Vitro</i>	24
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	26
	6.1. Kesimpulan	26
	6.2. Saran	26
	DAFTAR PUSTAKA	27
	LAMPIRAN	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian	17
2. Oosit sapi yang tidak mengalami apoptosis.....	25
3.	

DAFTAR TABEL

Lampiran	halaman
Tabel 1. Pengaruh dosis TGF β <i>experiment</i> pada kultur oosit dari folikel ukuran diameter 3-5 mm terhadap perkembangan oosit sampai tahap Metafase II	20
Tabel 2. Pengaruh dosis TGF β <i>experiment</i> pada kultur oosit dari folikel ukuran diameter >5 mm terhadap perkembangan oosit sampai tahap Metafase II	20
Tabel 3. Jumlah oosit yang mengalami apoptosis setelah dimaturasi <i>in vitro</i> dengan suplementasi TGF β pada kelompok folikel 3-5 mm	24
Tabel 4. Jumlah oosit yang mengalami apoptosis setelah dimaturasi <i>in vitro</i> dengan suplementasi TGF β pada kelompok folikel >-5 mm	24

Daftar Lampiran

Lampiran 1. Analisis statistik tingkat kematangan oosit.....	31
Lampiran 2. Analisis statistik apoptosis oosit.....	38
Lampiran 3. Pewarnaan Tunel	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Salah satu faktor yang menyebabkan produksi embrio *in vitro* rendah adalah hasil maturasi oosit yang heterogen sehingga menyebabkan proses pematangan (kapasitasi) tidak berjalan sempurna (Hytell *et al*, 1997). Ekspansi kumulus sangat menentukan kematangan oosit, mengingat kumulus mengandung berbagai bahan aktif yang diperlukan oosit selama meiosis. Pada proses ekspansi kumulus selain dipengaruhi oleh hormon juga dipengaruhi oleh *growth factor* (faktor pertumbuhan). Penambahan faktor pertumbuhan ke media pematangan dan media pembiakan mengatur perkembangan folikel antara lain meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel kumulus (Margawati, 1999).

Faktor pertumbuhan adalah *hormone-like polypeptide* dan protein, yang bekerja secara parakrin dan autokrin yang merangsang aktivitas mitogenik pada jaringan yang mengalami proliferasi seperti transformasi folikel ovarium menjadi korpus luteum (Hafez, 2000).

Salah satu dari faktor pertumbuhan yang dihasilkan folikel pada mamalia adalah *Transforming Growth Factor* β (TGF β). Frandson (1992) menyebutkan bahwa *growth hormone* mempunyai pengaruh penting didalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel, karena *growth hormone* mempunyai peran dalam meningkatkan transpor asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam-asam amino hingga terbentuk protein.

TGF β memiliki banyak peran pada sel kultur. TGF β mempengaruhi proses pematangan oosit. TGF β mempunyai efek menurunkan produksi cAMP yang dihasilkan oleh kompleks kumulus oosit. Peningkatan level cAMP akan menghalangi pematangan oosit. (Feng *et al*, 1988; Saragiieta *et al*, 2002, Vitt *et al*, 2000).

Transforming growth factor β sangat mempengaruhi fungsi sel granulosa sehingga apabila terjadi ekspresi prematur atau over ekspresi dari reseptor *Transforming growth factor* β dalam membran sel granulosa akan menyebabkan perubahan mekanisme kerja *Transforming Growth Factor* β pada sel granulosa. (Godkin and Dore, 1998 ; Osterland and Fried, 2000)

Menurut Prochazka, *et.al* (2003) TGF β mempunyai peran penting dalam mengaktifkan TGF β dengan aktivitas *tyrosin kinasenya* untuk merangsang perluasan Oosit Kumulus Komplek (OKK). TGF β dengan aktivitas *tyrosin kinase* diaktifkan oleh ikatan TGF β , dan menghasilkan TGF β *autophosphorylase* dan *tyrosine phosphorylase* yang berasal dari banyak substrat di dalam sel tersebut. TGF β *tyrosine phosphorylase* memungkinkan interaksi antara pertukaran protein dan pengaktifan beberapa substrat *tyrosin kinase*. Dan melalui substrat-substrat tersebut OKK merespon EGF melalui TGF β dengan aktivitas *tyrosin kinase* untuk merangsang perluasan OKK terutama sel-sel kumulus.

Secara *in vitro*, TGF β dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) membantu perluasan OKK pada tikus, babi, sapi dan kelinci. Perluasan OKK diikuti dengan peningkatan asam hyaluronik yang diperkaya matriks ekstraselular dan modifikasi *gap junction* antara sel kumulus dan oosit.

Selanjutnya, terjadi pelepasan kompleks kumulus oosit dari folikel selama ovulasi, kemudian oosit dewasa ditangkap oleh fimbria oviduct dan oviduct akan memelihara kelangsungan hidup oosit tersebut. Perluasan sel-sel kumulus menciptakan lingkungan mikro (*microenvironment*) yang sesuai untuk pengaktifan dan motilitas sperma.

Produksi asam hyaluronik secara signifikan membesar di dalam OKK dengan bantuan FSH atau TGF β . Peningkatan kemampuan OKK dalam memproduksi asam hyaluronik untuk perluasan berhubungan erat dengan TGF β dan FSH (Prochazka *et al.*, 2002).

Ekspansi kumulus sangat dipengaruhi oleh proliferasi sel, penurunan proliferasi sel kumulus akan mempengaruhi kematangan oosit secara keseluruhan. Penurunan proliferasi sel kumulus diindikasikan adanya kematian sel, oleh karena itu perlu diketahui terjadinya apoptosis pada sel kumulus untuk menentukan kualitas oosit yang dihasilkan.

Apoptosis terjadi selama masa pertumbuhan sebagai mekanisme homeostatik untuk mempertahankan populasi sel dalam jaringan. Walaupun secara detail pemahaman jalur-jalur sinyal yang menstimulasi apoptosis masih belum lengkap, namun proses ini dikontrol oleh beberapa protein kompleks, yang diaktivasi oleh berbagai jenis stimulan. Salah satu regulator penting pada mekanisme apoptosis adalah protein BCL-2. Overekspresi BCL-2 melindungi limfosit dari apoptosis dan memungkinkan sel tersebut berproliferasi. Bila ekspresi BCL-2 menurun maka protein proapoptosis seperti Bax akan meningkat. Keseimbangan antara BCL-2 dan Bax memainkan peran penting untuk memelihara keseimbangan kelangsungan hidup dan kematian sel yang

menjadi esensi dari determinasi potensi apoptosis dari sel. Aktivitas apoptosis yang tinggi selalu dihubungkan dengan tingkat rasio BCL-2/Bax (Ghobrial *et al.*, 2005 ; Reed, 2000).

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah suplementasi TGF β dapat meningkatkan kematangan oosit ?
2. Apakah suplementasi TGF β dapat mencegah jumlah oosit yang apoptosis ?



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Perkembangan Sel Telur

Oogenesis adalah proses pembentukan, pertumbuhan dan pematangan sel kelamin betina. *Oogenesis* berhenti menjelang lahir. Secara umum *oogenesis* dibagi menjadi tiga tahap yaitu proliferasi atau pembentukan oogonia, tahap pertumbuhan atau *folikulogenesis* dan tahap pematangan atau maturasi (Tomaszewka *dkk*,1991).

Pada tahap proliferasi *sel germinal primordial* membagi diri secara mitosis, hasil proliferasi berupa oogonium. Jumlah oogonium untuk setiap ovarium berkisar antara 40.000-300.000 bahkan lebih bergantung pada jenis hewan. Tahap pertumbuhan dimulai sejak hewan menginjak umur dewasa kelamin. Tahap pertumbuhan ditandai oleh isi sitoplasma bertambah banyak oleh kuning telur (*deuteroplasma*), terbentuknya *zona pelusida* dan terjadi proliferasi sel-sel folikel. Sel-sel folikel bertindak sebagai pengasuh dan memberi nutrisi pada *deuteroplasma*. Hasil tahap pertumbuhan berupa oosit primer ($2n$); Pertumbuhan oogonium menjadi oosit primer dapat dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama terjadi pertumbuhan yang cepat disertai dengan perkembangan folikel kira-kira sampai terbentuknya antrum folikel. Tahap berikutnya oosit tidak bertambah besar, tetapi folikel dengan cepat bertambah besar disebabkan oleh hormon yang dihasilkan oleh kelenjar *hipofise* (Gilbert, 1988).

Tahapan pertama perkembangan folikel terjadi pada waktu hewan betina masih dalam kandungan dan setelah lahir. Dalam tahap ini terjadi folikel primer

yang berasal dari satu sel epitel benih yang membelah diri. Pertumbuhan pada tahap kedua meliputi pertumbuhan folikel primer menjadi folikel sekunder, ini terjadi pada waktu betina telah lahir dan menjalani proses pendewasaan tubuh. Tidak semua folikel primer menjadi folikel sekunder tapi hanya sebagian saja, menurut perkiraan kurang dari sepertiga dari jumlah folikel primer.

Pada tahap ketiga terjadi perkembangan selanjutnya folikel sekunder menjadi folikel tertier yang ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulosa, sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan. Pertumbuhan folikel tertier menjadi folikel *de Graff* oleh beberapa peneliti hanya dinyatakan sebagai proses pemasakan saja, sebab folikel tertier hanya berbeda besarnya dan terjadi hanya beberapa hari menjelang estrus (Ismudiono, 1999).

Folikel *de Graff* berkembang terus yang diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum, pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel theca, yang akan merangsang pelepasan *luteinizing hormone* (LH) sekresi LH ini akan menggertak terjadinya ovulasi. Saat akan terjadi pelepasan polar body I dan ovum memasuki pembelahan meiosis II (Hafez, 2000).

2.2. Pematangan Oosit Secara *In Vitro*

Oosit beristirahat pada profase I dari meiosis selama periode embrional. Penyelesaian dari pembelahan meiosis pertama terjadi ketika oosit telah melewati pertumbuhan secara ekstensif dalam interaksi seluler dengan sel-sel granulosa dan sel-sel theca. Oosit melepaskan *polar body I*, yang mengandung kromosom pelengkap haploid. Setelah pembelahan meiosis pertama sempurna, dan

pembelahan meosis kedua dimulai, tetapi oosit tetap beristirahat pada tahap metafase II sampai terjadi kontak dengan sel spermatozoa (Mousa, 2002)

Oosit preovulasi akan mengalami proses diferensiasi yang ditandai dengan pematangan inti dan sitoplasma, pematangan oosit diinduksi oleh *luteinizing hormone* (LH). Impuls hormon keluar saat inti dari oosit masih pada periode *germinal vesicle* (inti belum berkembang). Begitu terjadi sekresi LH dimulailah perkembangan dari inti yang diikuti oleh perkembangan dari sitoplasma. Beberapa jam setelah LH mencapai puncaknya, inti oosit akan membesar dan bergerak ketepi kemudian melebur, kondisi inilah yang kemudian disebut inti dalam keadaan *germinal vesicle break down*. Selanjutnya akan terjadi pembelahan meosis menjadi metafase I yang selanjutnya berkembang menjadi metafase II (Gilbert, 1998).

Pematangan sitoplasma dapat diamati melalui diferensiasi sel-sel granulosa oosit yang sudah mengalami pematangan sitoplasma, sel-sel granulosa akan tampak longgar, sedangkan kondisi oosit yang belum matang, sel-sel granulosa akan tampak rapat dan berwarna hitam, pada akhir proses pematangan akan tampak *cumulus oophorus expansion* yang ditandai dengan matriks dominan seperti mucus, oosit yang tidak mengalami pematangan akan menjadi *atresia* (Gilbert, 1998).

Menurut Hafez (2000) oosit yang dimaturasi secara *in vitro* menunjukkan potensi yang sangat rendah terhadap kemampuan fertilisasi dan perkembangan berikutnya. Penambahan hormon kedalam medium maturasi akan meningkatkan kualitas oosit yang dimaturasi secara *in vitro* sehingga dapat memperbaiki potensi oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrional selanjutnya.

Medium yang digunakan untuk *in vitro maturation* (IVM) berbeda-beda antara laboratorium. Harus diperhatikan bahwa medium kultur pada IVM bisa mempengaruhi oosit untuk mencapai metafase II sehingga mampu menjalani fertilisasi dengan baik. Medium kultur untuk IVM secara garis besar bisa dibagi menjadi media sederhana dan media kompleks. Media sederhana biasanya terdiri dari sistem *buffer bikarbonat* dengan dasar *physiological saline* yang ditambah *pyruvate*, *laktosa*, dan *glukosa*. Perbedaan yang mendasar dari dua jenis media tersebut terletak pada konsentrasi ion dan konsentrasi sumber energi. Media biasanya ditambah dengan sedikit antibiotik (*penicillin*, *streptomycin*, *gentamycin*). Media kompleks tersusun dari media sederhana yang ditambahkan asam amino, vitamin, purin, dan zat-zat lain. Biasanya kadarnya disamakan dengan kadar dalam serum. Media kompleks yang sering digunakan pada oosit sapi adalah *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199) dengan *Early's salt*, *L-Glutamine* dan 25mM *HEPES* yang diberi suplemen 10-20% serum yang di inaktivasi dengan panas (bisa fetal calf serum, calf serum, steer serum, atau estrus cow serum). Media lain yang biasa digunakan adalah *Ham's F-10*, *MEM*, *101*, *CR1aa*, *Synthetic Bovine Oviductal Fluid Medium* dan lain-lain. Dianjurkan untuk menambahkan serum sehingga kondisinya dapat menyerupai maturasi *in vivo* (Duran,1998).

Serum sapi birahi (ECS) dan serum kuda birahi (EMS) dapat dipakai sebagai pengganti suplementasi FSH-LH-E2 yang sering dipakai dalam pematangan oosit sapi. Hal ini disebabkan oleh karena persentase pematangan oosit yang dicapai pada masing-masing suplementasi tidak berbeda secara nyata.

Keberhasilan maturasi oosit selain tergantung dari media dan zat aditifnya, juga tergantung kualitas inkubator CO₂ yang digunakan. Inkubator yang baik akan dapat mendistribusikan dan mengatur konsentrasi CO₂ secara tetap dan merata dan dengan suhu yang tidak terlalu banyak berubah sekitar 38⁰C. Inkubasi dalam media TCM 199 selama 18 dan 24 jam tidak ada perbedaan bermakna terhadap angka maturasi yaitu masing-masing 71% dan 76% (Povokief *et al*, 1992)

2.3. Seleksi Ukuran Folikel

Pengukuran diameter folikel merupakan salah satu cara praktis untuk menyeleksi oosit agar memiliki kemampuan penuh sehingga mampu mendukung perkembangan embrionik selanjutnya. Hal ini tampak pada folikel yang ukuran diameter kurang dari 100 um diketahui tidak memiliki kemampuan untuk mendukung proses perkembangan embrionik setelah maturasi. Sedangkan folikel yang ukuran diameter lebih dari 100 um memiliki kemampuan penuh untuk menyelesaikan maturasi meotic mencapai tahap metafase II dan mendukung perkembangan embrionik (Hytell *et al*, 1997).

Oosit yang dikoleksi dari folikel yang ukuran diameter kurang dari 100µm, aktifitas metabolisme tidak berlangsung secara maksimal. *Intermediate glycotie, amino acid*, ATP dan molekul-molekul lain yang diproduksi oleh sel-sel kumulus yang mungkin dikeluarkan oleh oosit tidak mampu mendukung proses pematangan oosit secara penuh. Proses metabolisme ini sangat penting dalam menyediakan energi untuk memasuki tahap maturasi selanjutnya (Rieger dan Luskutiff, 1994).

Pada proses maturasi *in vitro*, oosit yang diperoleh dari folikel yang ukuran diameter heterogen menyebabkan pertumbuhan oosit secara *in vitro* tidak dapat mencapai perkembangan yang optimal dan kondisi ini sangat mempengaruhi proses perkembangan selanjutnya. Hal ini sangat mempengaruhi aspek perkembangan pada saat proses *fertilisasi in vitro* maupun kultur *in vitro*, sehubungan dengan ini oosit *in vivo* lebih baik dari pada oosit *in vitro* (Kim *et al.*, 2000).

Penilaian kematangan oosit berdasarkan morfologi menurut Monk (1987) di bagi 4 kelompok:

1. Grade A: Oosit bulat tampak jelas, dikelilingi oleh sel granulosa secara utuh sebanyak lebih dari dua lapis.
2. Grade B: Oosit bulat tampak jelas, dikelilingi oleh sel granulosa tidak penuh atau dua lapis.
3. Grade C: Oosit tampak jelas, tetapi dikelilingi oleh sel granulosa kurang dari dua lapis.
4. Grade D: Oosit bentuknya tidak bulat lagi dan tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Untuk grade C dan D biasanya dikeluarkan dari kultur.

2.4. Tinjauan Tentang *Transforming Growth Factor*

Transforming growth factor β (TGF β) termasuk famili polipeptida berantai-rantai disulfida dengan berat molekul 25 kDa. Strukturnya saling berkaitan, dimerik, yang meliputi lima TGF β isoformis, *activins*, *inhibins*, zat penghambat *mullerin*, protein morfogenik tulang (Yang and Roy, 2001). Pada mamalia, tiga isoform TGF β (TGF β 1, TGF β 2 dan TGF β 3) telah

diidentifikasi. Beberapa TGF β berupa cytokines multifungsional yang mempengaruhi proses seluler, menstimulasi diferensiasi, proliferasi dan adesi sel target (Saragiieta *et al*, 2002). TGF β dapat meregulasi proliferasi dan diferensiasi sel secara positif atau secara negatif tergantung dari tipe sel dan telah diimplikasikan dalam banyak peristiwa fisiologis seperti angiogenesis, fungsi imun, stereidogenesis, tissue remodeling dan perbaikan jaringan. Semua peristiwa ini berlangsung didalam endometrium uterus selama proses kehamilan atau siklus estrus, beberapa TGF β juga mempunyai peran pada fungsi reproduksi yang lain seperti pada proses maturasi sel telur (Lobb and Dorrington, 1992).

Reseptor spesifik terhadap TGF β telah ditemukan di hampir seluruh jenis sel mamalia dan efeknya bervariasi tergantung dari jenis sel dan tingkat pertumbuhan. Semua sel memiliki reseptor untuk TGF β dan secara potensial dapat merespon faktor pertumbuhan ini. Faktor pertumbuhan ini terikat dengan protein pengikat terlarut. TGF β secara langsung juga mengatur sintesis bermacam-macam molekul dalam sel (Vitt *et al*, 2000).

Peran TGF β secara biologis melalui permukaan reseptor sel tipe I, II dan III. Reseptor tipe I dan II berupa protein transmembran yang mengandung *domain cytoplasmic serine* atau *threonine kinase*. TGF β mengikat reseptor tipe II tetapi tidak mengikat reseptor tipe I. Reseptor tipe I mengenali reseptor tipe II pengikat – *ligand* kemudian bersama-sama membentuk kompleks heteromerik. Reseptor tipe I kemudian mengalami fosforilasi yang dikatalisir oleh kinase tipe II. Pada proses *fosforilisasi* ini tipe I melibatkan satu atau lebih protein sitoplasmik yang disebut smads. Pembentukan smads translokasinya ke inti sel dan berkaitan dengan faktor-faktor transkripsi gen. Kemudian reseptor

tipe III adalah proteoglycan tanpa domain *cytoplasmic kinase* dan berikatan dengan TGF β kereseptor tipe II.

2.5. Ekspresi *Transforming Growth Factor* Pada Proses Pematangan Oosit

Folikel adalah organ dinamis yang mengalami pertumbuhan dan perkembangan secara berkala. Folikel-folikel ini akan mengalami proliferasi, pertumbuhan, pematangan dan degenerasi. Aktivitas ini diatur oleh banyak sistem sel lain dan dipengaruhi oleh polipeptida *Transforming Growth Factor* β (Roy *et al.*, 1998).

Bioaktivitas TGF β diekspresikan secara konstitutif dalam sel, disamping itu ekspresi TGF β diketahui bersifat autoinduktif dan dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan didalam sel termasuk sel-sel folikel (Arici *et al.*, 1995)

Transforming Growth Factor β mempunyai peran steroid ovarii pada ekspresi *class protease* lain dalam endometrium seperti *plasminogen activator*, *serine protease* yang diregulasi oleh steroid ovarii yang berperan pada proses pematangan sel telur (Schatz dan Lockwood, 1993). Produksi *plasminogen activator* dipengaruhi oleh *progesteron* dan menurun seiring dengan penarikan dan penurunan *progesteron*. *Progesteron* menghambat sintesis *plasminogen activator* stromal dan merangsang sintesis *plasminogen activator inhibitor* (PAI-1) secara *in vitro*. TGF β memiliki efek serupa pada ekspresi *plasminogen activator* dan ekspresi PAI-1 dalam beberapa tipe sel, termasuk *trofoblas* (Graham, 1997). TGF β bersama *progesteron* meningkatkan *desidualisasi stroma* tetapi menahan stimulasi dari *progesteron* pada ekspresi *ekephalinase* stroma.

Peran regulasi dari TGF β uterin selama kehamilan meliputi desidualisasi ;apoptosis, perlekatan *trofoblas* ,pertumbuhan, invasi, diferensiasi ;*imonotoleransi*, produksi *cytokine*, hormon dan *embriogenesis*. Selama periode kebuntingan ekspresi TGF β yang terkarakterisasi dalam uterus adalah identifikasi TGF β 1 atau TGF β 2 pada *fetal maternal interface* (Lea *et al.*, 1995). TGF β dalam matriks ekstraselular sel-sel desidual (Graham *et al.*, 1997) menyediakan *resivior* TGF- β laten yang diaktifkan oleh proteinase turunan-trofoblas. Identifikasi reseptor I, II dan III TGF β dalam endometrium mengindikasikan bahwa sel-sel ini reponsif terhadap TGF β maternal dan embrionik (Roelen *et al.*, 1994). TGF β diketahui berperan dalam proses implantasi.

Pada saat implantasi diyakini TGF β berperan sebagai *immunotoleransi maternal* terhadap *allogenic conceptus*. Regulasi respon imun TGF β bervariasi dari kemotaksis sampai supresi aktifitas makrofag dan aktivitas sel-T. Sel-sel leukosit dalam desidua tikus mengekspresikan transkrip TGF β 2 dan melepaskan faktor immunoprotein yang menetralsir antibodi spesifik anti- TGF β 2. Produksi TGF β oleh sel-sel prekursor pada *fetomaternal interface* berfungsi melindungi embrio dari serangan immunologis sel-sel efektor maternal (Clark *et al.*, 1990; Lea *e tal.*, 1995).

Transforming Growth Factor β mempengaruhi fungsi sel ovarium pada berbagai spesies. Interaksi *ligand-ligand* ini terjadi selama *folikulogenesis* dan *Epidermal Growth Factor* (EGF) mempengaruhi kerja TGF β pada folikel preantral dengan memodulasi transkripsi dan translasi reseptor TGF β . Untuk menentukan apakah EGF mempengaruhi mRNA reseptor TGF β . dan tingkat protein pada sel-sel granulosa selama *folikulogenesis*, dapat dilakukan dengan

cara folikel preantral hamster dikultur dengan dan tanpa adanya EGF, dan tingkat protein diamati dengan RT-PCR kuantitatif dan *immunoblotting*. Selanjutnya, kenaikan signifikan dalam tingkat mRNA reseptor TGF β . tampak pada folikel preantral yang lebih besar. Secara fungsional TGF β 1 melemahkan sintesis DNA yang diinduksi EGF untuk folikel dan tanpa mempengaruhi produksi progesteron. Dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara EGF dan TGF β membentuk suatu mekanisme regulasi yang penting untuk folikulogenesis preantral. Respon folikel terhadap TGF β tergantung pada status perkembangan folikel (Yang and Roy., 2001).

2.6. Tinjauan Tentang Apoptosis

Ada dua pola kematian sel, yaitu nekrosis dan apoptosis. Nekrosis lenih sering terjadi setelah adanya rangsangan eksogen, stres oleh karena trauma kimia. Nekrosis terjadi sebagai manifestasi dari pembengkakan sel yang berat ataupun ruptur sel, denaturasi dan koagulasi protein sitoplasma dan kerusakan dari organel sel. Apoptosis terjadi pada sel yang mati oleh karena program bunuh diri dengan kontrol internal melalui sekelompok produk gen dari sel itu sendiri (Cotran *et al*, 2004).

Apoptosis merupakan bentuk fisiologis kematian sel, bersama dengan mitosis mengendalikan jumlah sel dalam jaringan. Dengan kemajuan teknologi biologi molekuler, menyebabkan pengetahuan tentang apoptosis berkembang dengan pesat sampai ditemukannya gen spesifik yang merupakan media apoptosis, sehingga diketahui bahwa apoptosis terjadi pada sejumlah proses biologis baik proses fisiologi maupun patologis (Cotran *et al*, 2004)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan umum

1. Meningkatkan kualitas oosit yang dihasilkan secara *in vitro*.
2. Mengoptimalkan produksi embrio sapi untuk keperluan *transfer embrio* dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan sebagai sumber sel telur.

3.1.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Membuktikan hubungan suplementasi TGF β dengan tingkat kematangan oosit
2. Mengidentifikasi jumlah oosit yang apoptosis setelah proses maturasi *in vitro* sehingga dapat dicari solusi untuk mengatasi penyebab degenerasi oosit

3.2. Manfaat Penelitian

- Untuk mengetahui peran TGF β terhadap mekanisme apoptosis sel sehingga dapat memprediksi kualitas oosit yang dihasilkan secara *in vitro*
- Penelitian ini bisa mendukung penelitian tentang produksi embrio *in vitro* sebagai bank embrio dalam rangka keperluan *transfer embrio*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ovarium sapi yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH). Ovarium di bawa ke laboratorium *Fertilisasi in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan koleksi oosit dan maturasi oosit. Ukuran folikel yang diaspirasi adalah 3-5 mm dan >5 mm.

4.2. Alat Penelitian

Cawan petri disposable (nuclon), gunting, pinset, spuit disposable 5 ml, scorex, beker glass, mikroskop inverted, inkubator CO₂, gelas ukur, peralatan elektroforesis, peralatan untuk *radio immuno assay*

4.3. Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

Oosit sapi dengan kumulus komplek yang dikoleksi dari folikel ukuran 3 - 5 mm dan >5 mm yang sudah dilakukan proses maturasi.

Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

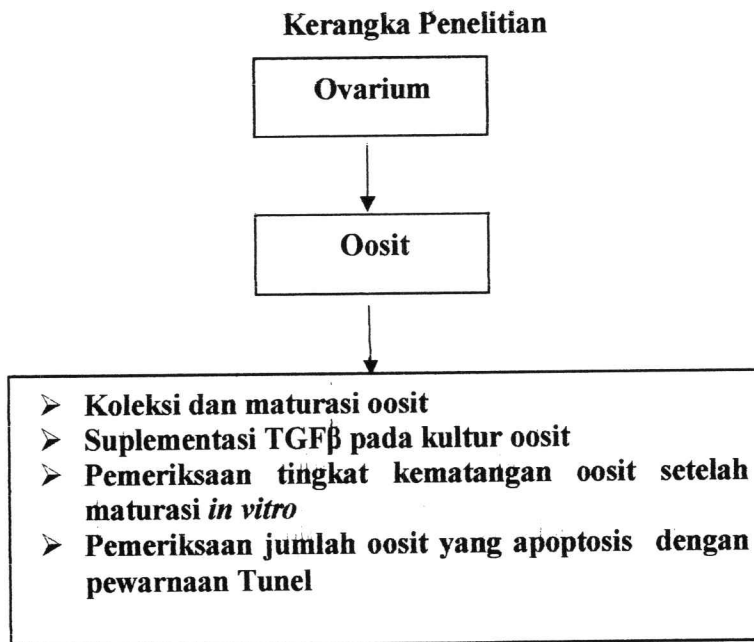
1. Tingkat kematangan oosit setelah dilakukan maturasi *in vitro*.
2. Jumlah oosit yang mengalami apoptosis setelah dilakukan maturasi *in vitro*

Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ruang penelitian, inkubator CO₂, peralatan, pemilihan alat ukur dari hasil penelitian, bahan-bahan yang digunakan pada penelitian.

4.4. Lokasi Penelitian

- Rumah Potong Hewan (RPH) untuk memperoleh ovarium.
- Laboratorium *Fertilisasi in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Unair untuk melakukan koleksi oosit dan maturasi oosit.
- Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair untuk pemeriksaan apoptosis



Gambar 1. Kerangka Operasional Penelitian

4.5. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

a. Koleksi Oosit

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan dan disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 µg/ml, pada suhu 30-35⁰C. Oosit diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran G 18 yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang telah diberi tambahan 0,3% *Bovine Serum Albumine* (BSA) dan 50 µg/ml gentamycin. Aspirasi dilakukan pada folikel ukuran 3 - 5 mm dan > 5 mm. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak 3 kali di dalam medium *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan 2 kali di dalam *Tissue Buffer Culture* (TCM) 199.

b. Suplementasi TGF β Pada Kultur *In Vitro* Oosit Sapi

Untuk proses maturasi oosit dipergunakan medium TCM yang ditambahkan 0,01 µg/ml FSH, 5% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Dosis suplementasi TGF β masing-masing 12,85 pg, 25,7 pg dan 38,55 pg (Widjiati,2007). Dua puluh oosit berdasarkan ukuran dan kelompoknya di kultur dalam 100 µl medium tetes dan ditutup dengan mineral oil. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38⁰C didalam inkubator CO₂ 5% selama 22 jam (Pawshé *et al.*, 1996).

c. Pemeriksaan Tingkat Kematangan Oosit Setelah Maturasi *In Vitro*

Setelah 22 jam maturasi *in vitro*, oosit difiksasi didalam asam asetat : etanol (1 : 3) selama 4-5 hari. Selanjutnya diwarnai *arceto-arcein* 1% kemudian dibilas dengan larutan pencuci. Oosit diperiksa dibawah mikroskop fase kontras untuk menentukan persentase oosit yang berkembang sampai tahap *Germinal Vesicle*, *Germinal Vesicle Break Down (GVBD)*, Metafase I dan Metafase II berdasarkan kelompok perlakuan.

d. Pemeriksaan Apoptosis Sel Setelah Maturasi *In Vitro*

Oosit yang telah dimaturasi, selanjutnya difiksasi dengan formalin buffer 10 %. Kemudian dilakukan dehidrasi dan rehidrasi. Kemudian di embaging selanjutnya dipotong dengan mikrotom. Pengecatan menggunakan *apop Tag Kit*, sel yang apoptosis akan tampak inti berwarna coklat, sedang sel yang sehat berwarna hijau.

f. Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Data yang diperoleh dari tingkat kematangan oosit dan jumlah apoptosis diuji dengan Anova (Steel and Torrie, 1991)

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Suplementasi TGF β Tingkat Kematangan Oosit

Jumlah oosit yang dikoleksi dari folikel ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan > 5 mm yang mencapai tahap *metafase* II setelah dimaturasi secara in vitro dengan suplementasi TGF β adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Pengaruh dosis TGF β *experiment* pada kultur oosit dari folikel ukuran diameter 3-5 mm terhadap perkembangan oosit sampai tahap *Metafase* II

Dosis TGF β (pg)	Perlakuan	
	Kumulus+hormon	Kumulus - hormon
0	1,67 \pm 1,15 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a
12,85	2,33 \pm 0,57 ^a	2,33 \pm 0,57 ^{ab}
25,7	6,33 \pm 1,52 ^b	2,00 \pm 0,00 ^{bc}
38,55	7,32 \pm 0,57 ^b	3,33 \pm 0,57 ^c

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P,0<05)

Tabel 2. Pengaruh dosis TGF β *experiment* pada kultur oosit dari folikel ukuran diameter >5 mm terhadap perkembangan oosit sampai tahap *Metafase* II

Dosis TGF β (pg)	Perlakuan	
	Kumulus+hormon	Kumulus - hormon
0	0,67 \pm 0,47 ^a	0,67 \pm 0,94 ^a
12,85	5,00 \pm 0,00 ^b	1,67 \pm 0,94 ^a
25,7	5,00 \pm 0,00 ^b	2,00 \pm 0,82 ^a
38,55	5,00 \pm 0,00 ^b	4,67 \pm 0,47 ^b

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P,0<05)

Kultur oosit kumulus komplek yang ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β , ukuran folikel, interaksi antara dosis dan ukuran folikel setelah dianalisa secara statistik berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap *metafase* II (tabel 1 dan 2).

Kultur oosit kumulus kompleks yang tidak ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β dan ukuran folikel berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi sedangkan variasi antara dosis dan ukuran folikel berpengaruh nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap metafase II .

Kultur oosit kumulus kompleks yang ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β , ukuran folikel, variasi antara dosis dan ukuran folikel berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap metafase II.

Proses pematangan inti berjalan bila sudah ada LH *surge*. Selama proses maturasi berlangsung, melibatkan banyak faktor yang berperan untuk sintesa protein disamping adanya growth factor seperti *Transforming Growth Factor* dan lain-lain yang semuanya saling mendukung sehingga oosit mempunyai *meotic competence*. Selama proses meiosis oosit diatur oleh *maturation promoting factor* (MPF), berupa protein kinase yang aktivitasnya memicu reaksi yang menyebabkan membran ini menghilang sehingga proses pematangan inti dimulai (Hendriksen *et al.*, 2000)

Meotic competence erat hubungannya dengan ukuran oosit dalam arti berhubungan dengan ukuran folikel. Ukuran folikel antral mempunyai *meotic competence* yang spesifik. Oosit sapi ukuran 3-5 mm mempunyai kemampuan menyelesaikan tahap GVBD dan meiosis. Menurut Abdon (2001) oosit yang berasal dari folikel besar lebih mampu berkembang dari pada oosit dari folikel sedang, karena folikel besar mampu menyediakan lingkungan makro yang bisa menunjang kualitasnya.

Menurut Yang and Roy (2001) tidak terdapat perbedaan antara folikel sedang dan folikel besar. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian kami bahwa sebenarnya dilihat dengan angka tidak terdapat perbedaan kualitas oosit yang dikoleksi dari folikel sedang dan besar sama-sama tinggi meskipun folikel besar nilainya jauh lebih tinggi. Perlu diingat oosit yang dikoleksi dari folikel besar dari awal memang sudah memasuki tahap pematangan sehingga kemungkinan terjadi *over mature* adalah besar. Hasil penelitian terakhir menunjukkan bahwa oosit dari folikel dominan (>13 mm) menghasilkan oosit dengan kualitas yang tidak selalu terbaik dalam arti jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II cukup tinggi tetapi belum tentu menghasilkan angka fertilitas juga tinggi.

Penambahan hormon FSH dan LH pada maturasi oosit secara *in vitro* berpengaruh terhadap peningkatan perkembangan oosit mencapai tahap *germinal vesicle*, *germinal vesicle break down*, *metafase I* dan *metafase II* apabila didalam medium kultur tersebut sudah diinduksi dengan TGF β . Peningkatan ini berjalan seiring dengan peningkatan dosis induksi TGF β pada maturasi oosit dengan kumulus kompleks.

Pada kultur oosit dengan kumulus kompleks yang ditambah hormon dan TGF β dalam media kultur, peningkatan dosis suplementasi TGF β meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II, namun setelah diuji statistik lebih lanjut oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter folikel 3-5 mm dan penambahan dosis TGF β 38,55 pg memberikan tingkat kematangan oosit yang terbaik

Demikian juga pada kultur oosit dengan kumulus kompleks yang tidak ditambah hormon dan TGF β dalam media kultur, peningkatan dosis suplementasi

TGF β meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap *metafase II*, namun setelah diuji statistik lebih lanjut oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter folikel >5 mm dan penambahan dosis TGF β 38,55 pg memberikan tingkat kematangan oosit yang terbaik

Hormon FSH, LH dan estrogen sering digunakan sebagai zat aditif dalam medium kultur untuk meningkatkan kualitas oosit (Beker *et al.*, 2000). Penambahan media maturasi dengan hormon-hormon ini bermula dari dugaan keterlibatan hormon-hormon ini dalam proses maturasi *in vivo*. Namun demikian, folikulogenesis dan maturasi oosit diregulasi tidak hanya oleh gonadotropin dan steroid namun juga oleh beragam cytokine yang bekerja sebagai parakrin yang dihasilkan secara lokal. Diantara regulator ini terdapat beberapa faktor pertumbuhan antara lain TGF β (Beker *et al.*, 2000).

FSH akan merangsang sel kumulus mensekresi *estradiol*. FSH membutuhkan dua mediator penting yaitu *estradiol 17 β* dan *17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregmen 3-one* sebagai hormon-hormon penting masing-masing untuk melaksanakan pertumbuhan dan maturasi oosit. Sel kumulus memproduksi dua mediator *steroid* yang dipengaruhi oleh FSH. Perubahan *steroidogenesis* yaitu perubahan dari *estradiol* menjadi *estradiol 17 β* dan *17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregmen 3-one*, serta perubahan gen-gen oleh enzim cytochrome P450 selama proses *aromatase* yang selanjutnya akan meningkatkan reseptor LH (Senthilkumaran *et al.*, 2004)

Oosit dan sel kumulus berperan penting dalam regulasi penyinalan reseptor *estradiol* selama proses IVM. reseptor *estradiol* menekan produksi cAMP

selama meiosis. Sel kumulus sangat diperlukan untuk proses maturasi oosit dan fungsi regulasi oosit (Epig, 2001).

Oosit mensekresi GDF 9 yang merupakan ligand spesifik dari TGF β , yang selanjutnya memacu laju pertumbuhan folikel dan ovulasi (Juengel *et al.*, 2004). TGF β meregulasi proses pematangan dalam nukleus sehingga tanpa penambahan hormon secara eksternal, faktor-faktor didalam oosit mampu melakukan regulasi proses meiosis (Juengel and Naty, 2005).

5.2. Tingkat Apoptosis Oosit Setelah Maturasi *In Vitro*

Tabel 3. Jumlah oosit yang mengalami apoptosis setelah dimaturasi *in vitro* dengan suplementasi TGF β pada kelompok folikel 3-5 mm

Jumlah oosit hasil maturasi <i>in vitro</i>	Jumlah oosit yang mengalami apoptosis pada suplementasi TGF β			
	0 pg	12,85pg	25,7 pg	38,55 pg
20	0,33 \pm 0,57	0,33 \pm 0,57	0,33 \pm 0,57	0,67 \pm 1,15

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang sama dalam kolom yang berbeda menunjukkan tidak ada perbedaan (P,0<05)

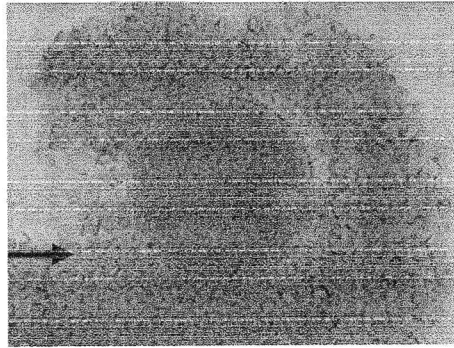
Tabel 4. Jumlah oosit yang mengalami apoptosis setelah dimaturasi *in vitro* dengan suplementasi TGF β pada kelompok folikel >5 mm

Jumlah oosit hasil maturasi <i>in vitro</i>	Jumlah oosit yang mengalami apoptosis pada suplementasi TGF β			
	0 pg	12,85pg	25,7 pg	38,55 pg
20	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,33 \pm 0,57

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang sama dalam kolom yang berbeda menunjukkan tidak ada perbedaan (P,0<05)

Ukuran oosit dan suplementasi TGF β tidak berpengaruh terhadap terjadinya apoptosis. Maturasi oosit secara *in vitro* juga tidak menyebabkan terjadinya apoptosis, hal ini terlihat dari angka statistik pada tabel 3 dan 4. Untuk

lebih jelasnya gambaran apoptosis pada oosit dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2. Oosit sapi yang tidak mengalami apoptosis

Rangsangan apoptosis dibangkitkan oleh sinyal yang ditransmisikan melalui membran plasma ke dalam molekul pengatur intra sel, atau langsung menuju target yang berada di dalam sel. Sinyal bisa berupa sinyal transmembran sendiri, juga bisa berupa sinyal merangsang atau sinyal menghambat. Sinyal merangsang berupa Fas, TNF, dan lain-lain. Sinyal menghambat apoptosis berupa hormon pertumbuhan, sitokin, enzim tertentu, dan lain-lain.

BAB VI.

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

1. Suplementasi *Transforming Growth Factor β* dosis 38,55 pg dalam medium kultur *in vitro* menghasilkan tingkat kematangan oosit yang terbaik
2. Suplementasi *Transforming Growth Factor β* pada proses maturasi oosit *in vitro* tidak menyebabkan apoptosis oosit.

6.2.Saran

Saran yang bisa disampaikan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk keperluan proses *fertilisasi in vitro* apabila menggunakan ovarium dari limbah rumah potong hewan sebaiknya menggunakan oosit yang diambil dari folikel dengan ukuran diameter permukaan diatas 3 mm supaya dapat diperoleh angka fertilitas dan viabilitas embrio tinggi.
2. Dalam jangka panjang perlu dipikirkan untuk melakukan isolasi *Transforming Growth Factor β* untuk keperluan ko kultur dalam rangka meningkatkan kualitas produksi *embrio in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Mc. Donald, F.C. and M.L. Casey. 1996. Modulation of the levels transforming growth factor β messenger ribonucleic acids in human endometrial stroma cells. *J. Biol. Reprod.* 54: 463-468
- Beker, A.R.C.L., F. Izadyar, B. Colenbrender and M.M. Bevers. 2000. effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation. *J. Theriogenology* 53: 1771-1782
- Clark D.A., K.C. Flanders, D. Banwatt, W. Millar-Book, J Manuel and B. Rowley. 1990. Murine pregnancy produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor β . *J. Immunology.* 144 : 3008-3014.
- Cotran R.S., V. Kuran and T. Collin. 2004. *Cellular Patology I : Cell Injury And Cell Death, Robbins Pathologic Basis of Disease, 7 th Ed.* WB Saunders Company hal : 3-46
- Duran D.H. 1998. Technical aspect of *in vitro* embryo production. *J. Anim. Reprod.* P : 1- 8
- Eppig J 2004. The role of the oocyte in regulating somatic cell function. Programme XIII International Workshop on the Development and function of the Reproductive Organs, 12-15 june, Copenhagen, Denmark. P : 1-5.
- Gilbert, S.F. 1988. *Development Biology.* 2nd Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts.
- Graham. C.H. 1997. Effect transforming growth factor β on the plasminogen activator system in culture first triseme human cytotrophoblast placenta. *J. Cell. Physiol.* 18 : 137 - 143
- Feng P., K.J Catt and M Knecht. 1988. Transforming growth factor beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *J Endocrinology*, 122 : 181 - 186
- Hafez E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal.* Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hyttel, P., I. Fair, H. Callsen and I. Greve. 1997. Oocytes Growth, Capacitation And Final Maturation In Cattle. *J. Theriogenology.* 47: 23-32.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Lab Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.*
- Juengel J.I² N.L. Hudson, L. Whiting and K.P. McNatty. 2004. effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth

- differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *J.Biol Reprod* 70 : 557-561.
- Juengel J.I. and K.P. Naty. 2005. The role of protein of the transformong growth factor β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update* 11 : 344-363
- Kim D. H., H. G Korg, S. W. Han, H. K Kim, D. S Ko, H. J Lee and K. S Churg. 2000. Developmental capacity of mouse oocytes derived from *in vitro* and *in vivo* grown preantl follicles. In *Proceedings Of The Annual Conference International Embryo Transfer Society Maastricht, The Netherlads*
- Lea R.G., F. Stewaer, W.R. Allen,, L Ohno and D.A.Clarck. 1995. Acumulation of kromotrope 2 R positive cell in equine endometrium during early pregnancy and expression of transforming growth factor β 2 . *J. Reprod and Fertil.* 103 : 339 – 347.
- Lobb, D.K and J Dorrington. 1992. Intraovarian regulation of follicular development. *J Anim Reprod Sci* 28 : 343 - 354
- Margawati, E.T. 1999. The effective of growth factor on in vitro embryo development. *Media veteiner* 6 (3) : 27 – 34
- Massague J. 1998. Transforming growth factor beta signal tranduction. *J. Annu.Rev. Biochem.* 67 : 753 – 791
- Mousa A.A. 2002. *In vitro* maturation of oocytes. A Review article. Alazhar school of Medicine.
- Pavokief A, A.Lucas, Hahn, and H.Niemann. 1992. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived form different categories of anthral follicles. *J. Mol. Reprod. Dev.* 31 : 63 – 67.
- Roelen B.A., H.Y.Lin, V. Knezevic, E. Freund and C.L. Mummery. 1994. Expression of transforming growth factor β and their receptors during implantaion and organogenesis of the mouse embryo. *J. Dev. Biol.* 166 : 716 – 728.
- Roy S.K., S.G Kurz, A.M.Carlson, C.J. Dc.Jonge. J.W. Ramey and V.M. Maclin. 1998. Transforming growth factor β receptor in hyperstimulated human granulosa cells and cleavage potential of the zigotes 59 : 1311 – 1316.
- Saraggieta,P.E., G.M. Lanuza and J L. Baranao. 2002. Autocrine role of transforming growth factor β 1 on rat granulose cell proliferation. *J. Biol of Reprod* 66 : 1862 – 1868

- Senthilkumaran B., M. Yoshikumi and Y. Nagahama. 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. 215 : 11-18
- Steel, R.G.D. dan J. H. Torrie. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik. Penerbit PT. Gramedia. Pustaka Utama, Jakarta.
- Tomaszewka, M.W., I.K. Utama, I.G. Putu dan T.D.Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Tung, J. Sheng, G.E. Mark and G.F. Hollis. 1994. Amicroplate assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 223,149-152.
- Vitt, U.A., M. Hayashi, C. Klein and A.J.W. Hsueh. 2000. Growth differentiation factor 9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone- induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *J. Biol. of Reprod.* 62 : 370 – 377.
- Yang P and S.K. Roy. 2001. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro*. *J Biol. Reprod.* 65 : 847 - 854

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis statistik tingkat kematangan oosit**1. Medium ditambah hormone****Univariate Analysis of Variance****Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
TGF 1.00	kontrol	3
(pg) 2.00	dosis 12.85	3
3.00	dosis 25.70	3
4.00	dosis 38.55	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Tingkat matang

TGF (pg)	Mean	Std. Deviation	N
kontrol	1.6667	1.15470	3
dosis 12.85	2.3333	.57735	3
dosis 25.70	6.3333	1.52753	3
dosis 38.55	7.3333	.57735	3
Total	4.4167	2.71221	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Tingkat matang

F	df1	df2	Sig.
1.895	3	8	.209

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Tingkat matang

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	72.250 ^a	3	24.083	22.231	.000
Intercept	234.083	1	234.083	216.077	.000
Dosis	72.250	3	24.083	22.231	.000
Error	8.667	8	1.083		
Total	315.000	12			
Corrected Total	80.917	11			

a. R Squared = .893 (Adjusted R Squared = .853)

Post Hoc Tests

TGF (pg)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Tingkat matang

	(I) TGF (pg)	(J) TGF (pg)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	kontrol	dosis 12.85	-.6667	.84984	.860	-3.3881	2.0548
		dosis 25.70	-4.6667*	.84984	.003	-7.3881	-1.9452
		dosis 38.55	-5.6667*	.84984	.001	-8.3881	-2.9452
	dosis 12.85	kontrol	.6667	.84984	.860	-2.0548	3.3881
		dosis 25.70	-4.0000*	.84984	.007	-6.7215	-1.2785
		dosis 38.55	-5.0000*	.84984	.002	-7.7215	-2.2785
	dosis 25.70	kontrol	4.6667*	.84984	.003	1.9452	7.3881
		dosis 12.85	4.0000*	.84984	.007	1.2785	6.7215
		dosis 38.55	-1.0000	.84984	.657	-3.7215	1.7215
	dosis 38.55	kontrol	5.6667*	.84984	.001	2.9452	8.3881
		dosis 12.85	5.0000*	.84984	.002	2.2785	7.7215
		dosis 25.70	1.0000	.84984	.657	-1.7215	3.7215
LSD	kontrol	dosis 12.85	-.6667	.84984	.455	-2.6264	1.2931
		dosis 25.70	-4.6667*	.84984	.001	-6.6264	-2.7069
		dosis 38.55	-5.6667*	.84984	.000	-7.6264	-3.7069
	dosis 12.85	kontrol	.6667	.84984	.455	-1.2931	2.6264
		dosis 25.70	-4.0000*	.84984	.002	-5.9597	-2.0403
		dosis 38.55	-5.0000*	.84984	.000	-6.9597	-3.0403
	dosis 25.70	kontrol	4.6667*	.84984	.001	2.7069	6.6264
		dosis 12.85	4.0000*	.84984	.002	2.0403	5.9597
		dosis 38.55	-1.0000	.84984	.273	-2.9597	.9597
	dosis 38.55	kontrol	5.6667*	.84984	.000	3.7069	7.6264
		dosis 12.85	5.0000*	.84984	.000	3.0403	6.9597
		dosis 25.70	1.0000	.84984	.273	-.9597	2.9597

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**Tingkat matang**

TGF (pg)	N	Subset	
		1	2
Tukey HSD ^{a,b} kontrol	3	1.6667	
dosis 12.85	3	2.3333	
dosis 25.70	3		6.3333
dosis 38.55	3		7.3333
Sig.		.860	.657

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.083.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

2. Medium tanpa ditambah hormon

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
TGF 1.00	kontrol	3
(pg) 2.00	dosis 12.85	3
3.00	dosis 25.70	3
4.00	dosis 38.55	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Tingkat matang

TGF (pg)	Mean	Std. Deviation	N
kontrol	1.0000	.00000	3
dosis 12.85	2.3333	.57735	3
dosis 25.70	2.0000	.00000	3
dosis 38.55	3.3333	.57735	3
Total	2.1667	.93744	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Tingkat matang

F	df1	df2	Sig.
10.667	3	8	.004

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Tingkat matang

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.333 ^a	3	2.778	16.667	.001
Intercept	56.333	1	56.333	338.000	.000
Dosis	8.333	3	2.778	16.667	.001
Error	1.333	8	.167		
Total	66.000	12			
Corrected Total	9.667	11			

a. R Squared = .862 (Adjusted R Squared = .810)

Estimated Marginal Means**1. TGF (pg)**

Dependent Variable: Tingkat matang

TGF (pg)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.000	.236	.456	1.544
dosis 12.85	2.333	.236	1.790	2.877
dosis 25.70	2.000	.236	1.456	2.544
dosis 38.55	3.333	.236	2.790	3.877

2. Grand Mean

Dependent Variable: Tingkat matang

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
2.167	.118	1.895	2.438

Post Hoc Tests

TGF (pg)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Tingkat matang

	(I) TGF (pg)	(J) TGF (pg)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	kontrol	dosis 12.85	-1.3333*	.33333	.017	-2.4008	-.2659
		dosis 25.70	-1.0000	.33333	.067	-2.0675	.0675
		dosis 38.55	-2.3333*	.33333	.001	-3.4008	-1.2659
	dosis 12.85	kontrol	1.3333*	.33333	.017	.2659	2.4008
		dosis 25.70	.3333	.33333	.754	-.7341	1.4008
		dosis 38.55	-1.0000	.33333	.067	-2.0675	.0675
	dosis 25.70	kontrol	1.0000	.33333	.067	-.0675	2.0675
		dosis 12.85	-.3333	.33333	.754	-1.4008	.7341
		dosis 38.55	-1.3333*	.33333	.017	-2.4008	-.2659
	dosis 38.55	kontrol	2.3333*	.33333	.001	1.2659	3.4008
		dosis 12.85	1.0000	.33333	.067	-.0675	2.0675
		dosis 25.70	1.3333*	.33333	.017	.2659	2.4008
LSD	kontrol	dosis 12.85	-1.3333*	.33333	.004	-2.1020	-.5647
		dosis 25.70	-1.0000*	.33333	.017	-1.7687	-.2313
		dosis 38.55	-2.3333*	.33333	.000	-3.1020	-1.5647
	dosis 12.85	kontrol	1.3333*	.33333	.004	.5647	2.1020
		dosis 25.70	.3333	.33333	.347	-.4353	1.1020
		dosis 38.55	-1.0000*	.33333	.017	-1.7687	-.2313
	dosis 25.70	kontrol	1.0000*	.33333	.017	.2313	1.7687
		dosis 12.85	-.3333	.33333	.347	-1.1020	.4353
		dosis 38.55	-1.3333*	.33333	.004	-2.1020	-.5647
	dosis 38.55	kontrol	2.3333*	.33333	.000	1.5647	3.1020
		dosis 12.85	1.0000*	.33333	.017	.2313	1.7687
		dosis 25.70	1.3333*	.33333	.004	.5647	2.1020

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**Tingkat matang**

TGF (pg)	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,b} kontrol	3	1.0000		
dosis 25.70	3	2.0000	2.0000	
dosis 12.85	3		2.3333	2.3333
dosis 38.55	3			3.3333
Sig.		.067	.754	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .167.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
- b. Alpha = .05.

Lampiran 2. Analisis statistik apoptosis oosit**1. Analisa apoptosis untuk oosit ukuran 3-5mm****Univariate Analysis of Variance****Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
TGF 1.00	kontrol	3
(pg) 2.00	dosis 12.85	3
3.00	dosis 25.70	3
4.00	dosis 38.55	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: apoptosis

TGF (pg)	Mean	Std. Deviation	N
kontrol	.3333	.57735	3
dosis 12.85	.3333	.57735	3
dosis 25.70	.3333	.57735	3
dosis 38.55	.6667	1.15470	3
Total	.4167	.66856	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: apoptosis

F	df1	df2	Sig.
2.286	3	8	.156

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.250 ^a	3	.083	.143	.931
Intercept	2.083	1	2.083	3.571	.095
Dosis	.250	3	.083	.143	.931
Error	4.667	8	.583		
Total	7.000	12			
Corrected Total	4.917	11			

a. R Squared = .051 (Adjusted R Squared = -.305)

Estimated Marginal Means

1. TGF (pg)

Dependent Variable: apoptosis

TGF (pg)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
kontrol	.333	.441	-.684	1.350
dosis 12.85	.333	.441	-.684	1.350
dosis 25.70	.333	.441	-.684	1.350
dosis 38.55	.667	.441	-.350	1.684

2. Grand Mean

Dependent Variable: apoptosis

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
.417	.220	-.092	.925

Post Hoc Tests

TGF (pg)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: apoptosis

	(I) TGF (pg)	(J) TGF (pg)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	kontrol	dosis 12.85	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 25.70	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.948	-2.3304	1.6637
	dosis 12.85	kontrol	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 25.70	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.948	-2.3304	1.6637
	dosis 25.70	kontrol	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 12.85	.0000	.62361	1.000	-1.9970	1.9970
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.948	-2.3304	1.6637
	dosis 38.55	kontrol	.3333	.62361	.948	-1.6637	2.3304
		dosis 12.85	.3333	.62361	.948	-1.6637	2.3304
		dosis 25.70	.3333	.62361	.948	-1.6637	2.3304
LSD	kontrol	dosis 12.85	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 25.70	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.608	-1.7714	1.1047
	dosis 12.85	kontrol	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 25.70	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.608	-1.7714	1.1047
	dosis 25.70	kontrol	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 12.85	.0000	.62361	1.000	-1.4380	1.4380
		dosis 38.55	-.3333	.62361	.608	-1.7714	1.1047
	dosis 38.55	kontrol	.3333	.62361	.608	-1.1047	1.7714
		dosis 12.85	.3333	.62361	.608	-1.1047	1.7714
		dosis 25.70	.3333	.62361	.608	-1.1047	1.7714

Based on observed means.

Homogeneous Subsets

apoptosis

TGF (pg)	N	Subset
		1
Tukey HSD ^{a,b} dosis 12.85	3	.3333
dosis 25.70	3	.3333
kontrol	3	.3333
dosis 38.55	3	.6667
Sig.		.948

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .583.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

**2. Apoptosis ukuran oosit >5 mm
Univariate Analysis of Variance**

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
TGF 1.00	kontrol	3
(pg) 2.00	dosis 12.85	3
3.00	dosis 25.70	3
4.00	dosis 38.55	3

Descriptive Statistics

Dependent Variable: apoptosis

TGF (pg)	Mean	Std. Deviation	N
kontrol	1.0000	.00000	3
dosis 12.85	1.0000	.00000	3
dosis 25.70	1.0000	.00000	3
dosis 38.55	1.3333	.57735	3
Total	1.0833	.28868	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: apoptosis

F	df1	df2	Sig.
16.000	3	8	.001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.250 ^a	3	.083	1.000	.441
Intercept	14.083	1	14.083	169.000	.000
Dosis	.250	3	.083	1.000	.441
Error	.667	8	.083		
Total	15.000	12			
Corrected Total	.917	11			

a. R Squared = .273 (Adjusted R Squared = .000)

Estimated Marginal Means**1. TGF (pg)**

Dependent Variable: apoptosis

TGF (pg)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.000	.167	.616	1.384
dosis 12.85	1.000	.167	.616	1.384
dosis 25.70	1.000	.167	.616	1.384
dosis 38.55	1.333	.167	.949	1.718

2. Grand Mean

Dependent Variable: apoptosis

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
1.083	.083	.891	1.276

Post Hoc Tests

TGF (pg)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: apoptosis

	(I) TGF (pg)	(J) TGF (pg)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	kontrol	dosis 12.85	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 25.70	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.525	-1.0881	.4215
	dosis 12.85	kontrol	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 25.70	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.525	-1.0881	.4215
	dosis 25.70	kontrol	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 12.85	.0000	.23570	1.000	-.7548	.7548
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.525	-1.0881	.4215
	dosis 38.55	kontrol	.3333	.23570	.525	-.4215	1.0881
		dosis 12.85	.3333	.23570	.525	-.4215	1.0881
		dosis 25.70	.3333	.23570	.525	-.4215	1.0881
LSD	kontrol	dosis 12.85	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 25.70	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.195	-.8769	.2102
	dosis 12.85	kontrol	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 25.70	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.195	-.8769	.2102
	dosis 25.70	kontrol	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 12.85	.0000	.23570	1.000	-.5435	.5435
		dosis 38.55	-.3333	.23570	.195	-.8769	.2102
	dosis 38.55	kontrol	.3333	.23570	.195	-.2102	.8769
		dosis 12.85	.3333	.23570	.195	-.2102	.8769
		dosis 25.70	.3333	.23570	.195	-.2102	.8769

Based on observed means.

Homogeneous Subsets

apoptosis

TGF (pg)	N	Subset
		1
Tukey HSD ^{a,b} kontrol	3	1.0000
dosis 12.85	3	1.0000
dosis 25.70	3	1.0000
dosis 38.55	3	1.3333
Sig.		.525

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .083.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 3. Pewarnaan Tunel

