

SKRIPSI

PENGARUH KOMBINASI KRIOPROTEKTAN ETILEN GLIKOL DAN SUKROSA PADA PROSES VITRIFIKASI SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*) TERHADAP ANGKA FERTILISASI SECARA *IN VITRO*



Oleh :

DHANI PRAKOSO
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH KOMBINASI KRIOPROTEKTAN ETILEN
GLIKOL DAN SUKROSA PADA PROSES VITRIFIKASI
SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*) TERHADAP
ANGKA FERTILISASI SECARA *IN VITRO***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

DHANI PRAKOSO

NIM : 069712479

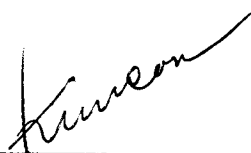
Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Widjiati, M.Si., drh.)

Pembimbing Pertama



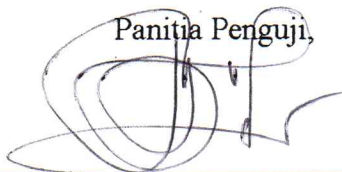
(Kuncoro Puguh S., M.Kes., drh)

Pembimbing Kedua

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

Menyetujui

Panitia Penguji,



Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., drh

Ketua



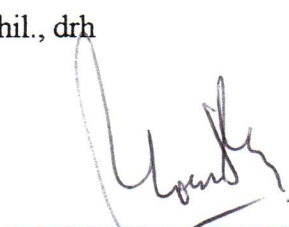
Dr. Hardijanto, M.S., drh

Sekretaris



Widjiati, M.Si., drh

Anggota



Nove Hidajati, M.Kes., drh

Anggota



Kuncoro Puguh S., M.Kes., drh

Anggota

Surabaya, 2 Desember 2002

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh

NIP. 130687297

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga kami dapat menyelesaikan penulisan makalah skripsi yang berjudul **“Pengaruh Kombinasi Krioprotektan Etilen Glikol Dan Sukrosa Pada Proses Vitrifikasi Sel Telur Mencit (*Mus musculus*) Terhadap Angka Fertilisasi Secara *In Vitro*”**.

Dengan penuh rasa hormat, penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta kepada Widjiati, M.Si., drh. selaku pembimbing pertama sekaligus pembimbing dalam penelitian ini dan kepada Kuncoro Puguh S., M.Kes., drh. selaku pembimbing kedua.

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada penanggung jawab Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, serta kepada Pudji Srianto M.Kes., drh dan Prof. Dr. Laba Mahaputra M.Sc., drh atas pinjaman kontainer N₂ cair selama penelitian berlangsung.

Terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada rekan-rekan penelitian Hani, Utik, Kiki dan Alan atas bantuan, kerjasama, serta dorongan semangatnya selama ini. *Et pour ma chérie Kiki, ik hou altijd van jouw*. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada rekan dan atasan di NEC yaitu Helen (Gendut) dan Ibu Paulina.

Ucapan terima kasih yang tulus kami sampaikan pada bapak, ibu dan

kakak-kakak atas dorongan semangat dan doa restunya. Kepada Nirma serta seluruh rekan-rekan yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu atas sumbangan saran dan dukungannya penulis sampaikan terima kasih.

Untuk penyempurnaan penulisan skripsi ini, kami mengharapkan kritik dan saran.

Surabaya, Oktober 2002

Penulis

**PENGARUH KOMBINASI KRIOPROTEKTAN ETILEN
GLIKOL DAN SUKROSA PADA PROSES VITRIFIKASI
SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*) TERHADAP
ANGKA FERTILISASI SECARA *IN VITRO***

Dhani Prakoso

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa terhadap angka fertilisasi sel telur mencit secara *in vitro*. Diharapkan penelitian ini dapat mengetahui angka fertilisasi pada mencit secara *in vitro* setelah sel telur divitrifikasi, sehingga dapat memberikan informasi ilmiah pada pengembangan ilmu pengetahuan di bidang bioteknologi khususnya tentang vitrifikasi sel telur.

Sel telur mencit didapat melalui superovulasi dengan menggunakan hormon PMSG dan HCG dengan dosis 5 IU pada mencit betina. Sel telur- sel telur yang didapat kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu P0 sebagai perlakuan kontrol tanpa etilen glikol, sukrosa dan vitrifikasi; P1 dengan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5%; P2 dengan etilen glikol 20% dan sukrosa 0,5%; P3 dengan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,3% serta P4 dengan etilen glikol 20% dan sukrosa 0,3%. Perlakuan P1, P2, P3 dan P4 kemudian divitrifikasi, selanjutnya di *thawing* dan kemudian dilakukan fertilisasi *in vitro*. Data yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan Chi Kuadrat.

Angka fertilisasi yang didapat dari masing-masing perlakuan adalah 93,48% pada P0; 81,82% pada P1; 81,25% pada P2; 66,67% pada P3 dan 66,67% pada P4.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa pada proses vitrifikasi sel telur mencit dapat mempertahankan angka fertilisasi dan hasil terbaik didapat pada perlakuan P1 dengan angka 81,82%.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
1.5. Hipotesis Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Sel Telur.....	5
2.2. Spermatozoa.....	7
2.3. Fertilisasi.....	9
2.4. Fertilisasi <i>In Vitro</i>	10
2.5. Superovulasi.....	12
2.6. Vitrifikasi.....	13
2.7. Krioprotektan.....	15
BAB III MATERI DAN METODE	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	20

3.2. Bahan dan Materi Penelitian.....	20
3.2.1. Hewan Penelitian.....	20
3.2.2. Bahan Penelitian.....	20
3.2.3. Peralatan Penelitian.....	21
3.3. Metode Penelitian.....	21
3.3.1. Persiapan Medium Kultur.....	21
3.3.2. Koleksi Sel Telur.....	21
3.3.3. Proses Vitrifikasi dan <i>Thawing</i> Sel Telur.....	22
3.3.4. Koleksi Spermatozoa.....	23
3.3.5. Fertilisasi dan Kultur <i>In Vitro</i>	24
3.4. Peubah yang Diamati.....	26
3.5. Analisis Data.....	26
 BAB IV HASIL PENELITIAN	
4.1. Sel Telur yang Terfertilisasi.....	27
4.2. Hasil Pengamatan.....	28
 BAB V PEMBAHASAN	
 BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan.....	35
6.2. Saran.....	35
RINGKASAN.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan Seluler Dan Kematian Pada Sistem Biologis Akibat Proses Pembekuan.....	14
Tabel 2 : Jumlah Sel Telur Yang Terfertilisasi.....	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 : Gambar Bangun Etilen Glikol.....	19
Gambar 2 : Gambar Bangun Sukrosa.....	19
Gambar 3 : Skema Pengemasan Sel Telur Dalam <i>Straw</i> Untuk Proses Vitrifikasi.....	23
Gambar 4 : Skema Penelitian.....	25
Gambar 5 : Uterus Mencit <i>In Situ</i>	29
Gambar 6 : Sel Telur Mencit (Pembesaran 200X).....	29
Gambar 7 : Sel Telur Yang Sedang Mengalami Proses Fertilisasi (Pembesaran 200X).....	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Data Jumlah Sel Telur Yang Terfertilisasi.....	44
Lampiran 2 : Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P1.....	46
Lampiran 3 : Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P2.....	47
Lampiran 4 : Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P3.....	48
Lampiran 5 : Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P4.....	49
Lampiran 6 : Pengenceran Hormon.....	50
Lampiran 7 : Komposisi Medium M16.....	51
Lampiran 8 : Komposisi PBS.....	52
Lampiran 9 : Krioprotektan.....	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Lebih dari satu dekade terakhir telah dicapai kemajuan dalam teknik kriopreservasi dari tipe sel yang berbeda, jaringan yang lebih kompleks bahkan organ. Perkembangan yang cepat ini juga mencakup kriopreservasi gamet mammalia (Niemann, 1991). Teknik kriopreservasi embrio merupakan alternatif teknologi yang tepat untuk mendukung transfer embrio karena embrio beku, yang kemudian di *thawing* dapat ditransfer kapan pun ketika hewan resipien tersedia.

Saat ini kriopreservasi embrio mengalami kendala yang berkaitan dengan masalah etis dan status legal dari embrio (Friedler *et al.*, 1988; Coticchio *et al.*, 2001). Akhir-akhir ini fokus utama studi dan penelitian di bidang fisiopatologi reproduksi diorientasikan pada kriopreservasi sel telur betina. Hal ini dapat memecahkan problem etis yang berhubungan dengan preservasi embrio dan kehamilan karena surplus sel telur yang dikoleksi setelah superovulasi ovarium (Tripodi *et al.*, 2001).

Dalam penelitian selama 15 tahun terakhir, hanya kemajuan kecil dapat dicapai dalam kriopreservasi sel telur (Parks and Ruffing, 1992). Sukses terbesar justru didapat dari sel telur mencit yang telah matang. Meskipun lebih dari 100 fetus atau anak normal telah diproduksi dari sel telur mencit hasil kriopreservasi melalui fertilisasi *in vitro* dan transfer embrio, rata-rata perkembangan keseluruhan masih terlalu rendah untuk diaplikasikan. Sebagai contoh, hanya 6 –

14% dari sel telur yang dibekukan secara konvensional dan 20 – 38% dari sel telur yang divitrifikasi memproduksi fetus atau anak. Hal ini berarti efisiensi keseluruhan kurang dari 65% jika dibandingkan dengan sel telur tanpa perlakuan (Rall, 1992).

Metode kriopreservasi yang umum dilakukan adalah metode *slow freezing*, tetapi metode ini membutuhkan waktu yang banyak dan peralatan yang mahal sehingga vitrifikasi menjadi fokus utama (Okada *et al.*, 2002). Sel telur, embrio, dan bahkan organ dapat divitrifikasi. Sel telur direndam dalam larutan yang mengandung satu atau beberapa macam krioprotektan konsentrasi tinggi, kemudian dicelupkan langsung kedalam nitrogen cair. Menurut Okada *et al.* (2002) metode ini memiliki beberapa keuntungan antara lain : tidak diperlukan program pembekuan yang rumit, waktu yang dibutuhkan tidak banyak dan tidak terdapat pembentukan kristal es intraseluler yang merupakan penyebab kerusakan sel selama pembekuan. Larutan vitrifikasi merupakan larutan yang *cytotoxic* dan terdapat kemungkinan untuk terjadi kerusakan osmotik dan *salt injury* karena krioprotektan konsentrasi tinggi dengan toksisitas biologis. Walaupun demikian metode vitrifikasi ini dapat diaplikasikan dengan mudah pada kondisi lapangan dan dapat dicoba untuk diaplikasikan pada berbagai macam spesies hewan domestik.

Etilen glikol sebagai krioprotektan intraseluler memiliki berat molekul yang lebih rendah jika dibandingkan dengan krioprotektan lain seperti propandiol, DMSO (*dimethylsulfoxide*) dan gliserol. Etilen glikol juga memiliki toksisitas yang rendah serta permeabilitas yang tinggi (Sommerfeld and Niemann, 1999;

Massip, 2001). Sukrosa memiliki ukuran dan berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan etilen glikol, sehingga sukrosa digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah vitrifikasi sel telur mencit dengan kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa dapat mempertahankan angka fertilisasi secara *in vitro* ?
2. Kombinasi konsentrasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa manakah yang memberi angka fertilisasi tertinggi ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa selama proses vitrifikasi sel telur mencit terhadap angka fertilisasi secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa pada proses vitrifikasi sel telur mencit terhadap angka fertilisasi secara *in vitro* ini diharapkan :

1. Dapat mengetahui angka fertilisasi pada mencit secara *in vitro* setelah sel telur divitrifikasi.
2. Memberikan informasi ilmiah pada pengembangan ilmu pengetahuan di bidang bioteknologi reproduksi khususnya tentang vitrifikasi sel telur.

1.5. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian yang dapat diajukan berdasarkan permasalahan tersebut diatas sebagai berikut :

1. Vitrifikasi sel telur mencit dengan kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa dapat mempertahankan angka fertilisasi secara *in vitro*.
2. Kombinasi konsentrasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa tertentu dapat memberi angka fertilisasi yang tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sel Telur

Folikel pada ovarium berasal dari epitel benih yang melapisi permukaan ovarium. Dalam proses perkembangannya, folikel melalui tingkatan-tingkatan perkembangan folikel primer, sekunder, tersier (yang sedang tumbuh) dan de Graaf (yang matang). Kemudian folikel yang telah masak ini pecah disertai dengan keluarnya ovum dari folikel tersebut, peristiwa ini disebut ovulasi (Ismudiono, 1999). Ovum yang telah diovulasikan ini disebut sel telur.

Selama pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium, terjadi dua proses yang mutlak perlu bagi produksi gamet betina. Pertama, membrana tambahan yang tersusun dari bahan mukopolisakarida dibentuk di sekeliling oosit akibat adanya aktifitas sintetik oosit itu sendiri. Sekresi membrana ini (zona pelusida) pada awalnya berupa kumpulan fibril tetapi pembentukan zona secara lengkap dan seragam terjadi jauh sebelum oosit berada di dalam folikel de Graaf. Kedua, terjadinya pertumbuhan oosit menjadi dewasa akibat kemampuan sintesis yang dimilikinya, dan bahan makanan oosit yang berasal dari sel somatik disekelilingnya. Oosit mempunyai banyak cadangan zat makanan di dalam sitoplasma (vitellin), diantaranya vesikula kuning telur dan timbunan seperti lemak lainnya yang khususnya menonjol dalam sel telur hewan ternak (Hunter, 1995).

Di dalam sel telur terdapat sitoplasma yang berisi nukleus dan bahan kuning telur yang terbungkus oleh selaput vitellin. Selaput vitellin dibungkus oleh zona pelusida yang transparan. Diantara vitellin dan zona pelusida terdapat ruang sempit yang berisi cairan disebut ruang perivitellin (perivitellin space). Sel telur juga diselubungi oleh lapisan sel kumulus yang berbentuk mahkota yang disebut sebagai korona radiata (Ismudiono, 1999).

Persyaratan sel telur yang memiliki kualitas yang baik adalah sel telur tersebut sudah mengalami proses pematangan inti dan sitoplasma. Pematangan ini secara mikroskopis pada inti akan tampak mengalami metafase II dan sitoplasma akan tampak sel-sel granulosa yang longgar dan berwarna terang.

Laufer *et al.* (1984) seperti yang dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) membagi tingkat kematangan sel telur berdasarkan penilaian morfologi sel telur-korona radiata-kumulus ooforus. Sel telur yang diisolasi dari folikel antral dapat dibagi menjadi :

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

Fase 1 : Kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak, sel telur tidak jelas.

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

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

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

Fase 4 : Kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar (*expanded cumulus*), sedikit berlendir (*musinifikasi*), sel telur tampak jelas tapi belum memiliki polar bodi I.

Fase 5 : Kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar (*expanded cumulus*), cukup berlendir, sel telur tampak jelas dan memiliki polar bodi I (metafase II).

c. *Post mature oocyte* :

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

d. *Degenerated oocyte* :

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

2.2. Spermatozoa

Spermatozoa terbentuk dalam testis melalui serangkaian pembelahan mitosis dan meiosis yang sangat khusus yang berawal dari spermatogonia di dalam epitel germinalis. Pembelahan ini menghasilkan sel haploid dengan genotip X atau Y sesuai dengan kromosom kelaminnya (Hunter, 1995).

Keseluruhan pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis. Leblond dan Clermont (1952) yang dikutip oleh Salisbury dan VanDemark (1985) membagi proses spermatogenesis pada tikus menjadi 4 fase golgi dan fase-fase ini akan dibagi lebih lanjut menjadi 19 tahap. Keempat fase ini adalah : fase golgi, dengan ciri-ciri terdapatnya granula akrosom di dalam idiosom spermatid; fase

mantel, dengan ciri-ciri granula akrosom membungkus satu kutub inti; fase akrosom, yaitu bila akrosom terbentuk dengan sempurna; dan fase pendewasaan, yaitu bila spermatozoa telah menjadi individu-individu yang bebas berdiri sendiri.

Spermatozoa normal terdiri dari kepala dan ekor dimana ekor dibagi menjadi bagian tengah (*mid-piece*), bagian utama (*main-piece*) dan bagian akhir (*end-piece*). Komponen penting dari kepala spermatozoa adalah nukleus yang mengandung kode genetik, *postnuclear cap* yang menutup bagian posterior nukleus dan akrosom yang menutup bagian anterior nukleus serta mengandung enzim yang dibutuhkan untuk penetrasi korona radiata dan zona pelusida pada proses fertilisasi (Bearden and Fuquay, 1992).

Dikatakan oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) sebagian besar proses kapasitasinya terjadi di dalam tuba Falopii, terutama didaerah isthmus. Komponen permukaan spermatozoa akan dimodifikasi atau tercuci oleh sekresi traktus genitalis sehingga membrana plasma spermatozoa yang terdiri atas lapisan rangkap fosfolipid (*phospholipid bilayer*) akan berubah dan diikuti oleh reaksi akrosom. Perubahan-perubahan yang terjadi pada spermatozoa ketika melintas melalui traktus genitalis adalah penurunan konsentrasi kolesterol pada permukaan spermatozoa, perubahan glikosaminoglikogen dan perubahan ion-ion.

Kapasitasi akan mengaktifkan akrosoma. Perubahan reaksi akrosom diperlukan oleh spermatozoa untuk dapat menembus masuk sel telur. Kapasitasi berperan mencegah aktivasi dini dari akrosom sampai spermatozoa mencapai tempat fertilisasi dan kontak dengan sel telur. Reaksi akrosom meliputi peleburan membran plasma spermatozoa dengan membran luar akrosom. Setelah peleburan

terjadi akan tampak vesikel-vesikel yang tersebar diseluruh permukaan anterior segmen akrosom. Peleburan membran dan vesikulasi akrosom akan melepas enzim hidrolitik seperti hyaluronidase dan akrosin yang berperan dalam penetrasi sel telur.

2.3. Fertilisasi

Fertilisasi dimulai dengan penetrasi spermatozoa ke sel telur dan berakhir ketika pronukleus jantan dan betina telah bersatu. Sebagai suatu proses genetik, proses ini menyatukan kromosom haploid jantan dengan kromosom haploid betina menjadi sebuah kromosom diploid (Enders, 1970).

Langkah pertama fertilisasi meliputi penetrasi spermatozoa ke dalam sel kumulus dan korona radiata dengan kepalanya melekat pada zona pelusida. Enzim hyaluronidase dan enzim penetrasi korona membantu proses ini. Kedua enzim ini terdapat pada kepala spermatozoa. Penetrasi zona pelusida oleh spermatozoa terjadi 5 – 15 menit setelah spermatozoa menempel dinding zona. Reaksi akrosom terjadi sebelum atau setelah kepala spermatozoa menempel pada reseptor gliko protein yang terdapat pada dinding zona (Ismudiono, 1999). Acrosin, enzim yang menyerupai trypsin terdapat pada kepala spermatozoa membantu penetrasi ini.

Bersamaan dengan proses itu terjadi reaksi zona. Reaksi zona menjaga agar tidak terjadi penetrasi spermatozoa lain pada zona pelusida. Penjagaan ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya polispermia, namun hal ini tidak selalu

berhasil, karena kadang-kadang terlihat spermatozoa lain di dalam ruang antara zona pelusida dan membrana vitelin.

Spermatozoa kemudian menembus membrana vitelin dengan cara fagositosis dan masuk ke sitoplasma. Terjadi reaksi blokade vitelin yang merupakan reaksi pertahanan kedua terhadap penetrasi spermatozoa lain. Sitoplasma mengkerut dan muncul polar bodi kedua. Terbentuk pronuklei jantan dan betina. Kemudian terjadi syngamy, penggabungan pronuklei. Ketika syngamy berakhir, terbentuk sigot dan fertilisasi berakhir (Bearden and Fuquay, 1992).

2.4. Fertilisasi *In Vitro*

Fertilisasi sel telur mamalia diluar tubuh, yaitu penetrasi sel telur oleh spermatozoa dalam suatu bentuk sistem biakan sel (Hunter, 1995). Awal penelitian tentang fertilisasi *in vitro* dimulai ketika M.C. Chang pada tahun 1959 berhasil mendapatkan anak kelinci yang berasal dari sel telur yang dikumpulkan dari tuba Falopii induk kelinci, kemudian dibuahi oleh sel mani dalam tabung dan embrio yang terbentuk ditransfer pada induk resipien (Hardjopranjoto, 1987; Bearden and Fuquay, 1992).

Proses fertilisasi *in vitro* ini agar berhasil membutuhkan maturasi sel telur dan kapasitas sel sperma yang simultan dan komplit. Banyak parameter lain yang berhubungan dengan suasana lingkungan gamet pada saat fertilisasi seperti temperatur, media, pH, jumlah dan atau kecepatan dilusi spermatozoa dapat memainkan peranan yang penting (Chemineau *et al.*, 1993).

Spermatozoa yang telah diejakulasikan oleh mamalia tidak dapat langsung membuahi sel telur, untuk itu spermatozoa harus mengalami proses kapasitasi, sebuah proses yang secara normal berlangsung di saluran reproduksi betina selama 30 menit hingga 10 jam atau lebih, tergantung pada spesies (Seidel, 1986).

Proses kapasitasi ini meliputi penghilangan protein membran stabilisasi pada permukaan spermatozoa. Destabilisasi membran dapat memfasilitasi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan membran sel telur selama proses fertilisasi (Seidel, 1986). Spermatozoa yang sudah mengalami kapasitasi di bagian kepalanya mengandung banyak enzim hyaluronidase yang berfungsi melisiskan asam hyaluronat dan menembus zona pelusida sel telur (Hardjopranjoto, 1987 ; Gilbert, 1988).

Secara *in vitro* spermatozoa dapat berkapasitasi dalam media yang mengandung cairan folikel, serum atau serum albumin. Kemampuan uterus menyediakan lingkungan untuk kapasitasi spermatozoa tergantung dari keseimbangan hormonal diantaranya estrogen yang dapat menstimulasi, sedangkan progesteron menghambat kapasitasi. Seluruh proses terjadi secara biokimiawi alamiah (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Kapasitasi spermatozoa pada fertilisasi *in vitro* bukanlah penghambat pada produksi embrio secara *in vitro*. Karena fertilisasi *in vitro* dapat menggunakan semen dengan kualitas kurang baik melalui penggunaan teknik mikromanipulasi seperti melubangi zona pelusida sel telur untuk membantu penetrasi spermatozoa ke dalam sel telur, atau menginjeksi spermatozoa secara langsung ke rongga perivitelin (Trounson, 1992).

Sejumlah besar oosit yang dikoleksi melalui penghisapan, penusukan, atau penorehan isi folikel akan kembali mengalami pematangan meiosis *in vitro*, mulai dari stadium inti diktiat (*dictyate*) sampai metafase I atau II, dan lama waktu pemasakan ini biasanya sangat sesuai dengan waktu yang diperlukan *in vivo* setelah terjadi pelonjakan sekresi gonadotropin praovulasi. Pendekatan atas pematangan sel telur ini berhasil dengan menggunakan medium biakan larutan garam yang relatif sederhana ditambah sumber protein seperti albumin serum (Hunter, 1995).

2.5. Superovulasi

Proses ini merupakan teknik dimana hewan betina diberi perlakuan, menggunakan hormon yang menyebabkan hewan ini memproduksi sel telur yang lebih banyak daripada sel telur yang biasa diproduksi secara normal pada setiap fase estrus (Bearden *and* Fuquay, 1992).

Superovulasi dapat dilakukan dengan menyuntikkan hormon PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) atau kombinasi PMSG dan HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) pada hewan betina yang telah mencapai remaja (Hardjopranto, 1995). Kondisi optimum untuk penggunaan preparat ini antara lain ditentukan oleh : total dosis, jumlah injeksi perhari, distribusi dosis perinjeksi (Chemineau *et al.*, 1993). Sementara penentuan waktu penyuntikan gonadotropin dalam kaitannya dengan gelombang pertumbuhan folikel hampir dapat dipastikan menentukan untuk memperoleh respon optimal, dan batasan yang

lebih seksama mengenai potensi biologi preparat hormon tidak diragukan lagi dapat memperbaiki pendugaan. (Hunter, 1995).

Faktor-faktor yang kurang menguntungkan pada superovulasi adalah adanya kenyataan bahwa superovulasi dapat menghasilkan sel telur yang belum dewasa, sehingga setelah pembuahan banyak terjadi kematian embrio yang masih muda (Hardjopranjoto, 1995). Selain itu variasi respon yang tinggi antara hewan dan penurunan respon dengan perlakuan berulang adalah merupakan beberapa masalah yang harus dipecahkan (Bearden *and* Fuquay, 1992).

2.6. Vitrifikasi

Menurut Massip (2001) vitrifikasi adalah suatu metode kriopreservasi dimana terjadi perubahan bentuk larutan dari cair menjadi padat dengan peningkatan viskositas yang disebabkan oleh krioprotektan konsentrasi tinggi dan pembekuan yang sangat cepat. Vitrifikasi dilakukan dengan cara mencelupkan langsung material yang akan dibekukan ke dalam nitrogen cair. Vajta (2000) mengungkapkan bahwa cara ini memiliki beberapa keuntungan, antara lain : lebih mudah dilakukan, efisiensi biaya serta prosedur yang lebih cepat.

Vitifikasi menghilangkan pembentukan kristal es selama proses pendinginan. Dalam proses vitrifikasi, pembentukan kristal es dihambat oleh krioprotektan. Molekul-molekul larutan tetap pada posisinya selama proses pendinginan, tidak terdapat gangguan dari bahan kimia atau komponen sel lain. Dikatakan oleh Kobayashi *et al.* (1990) dan Niemann (1991) bahwa mekanisme yang terjadi pada metode vitrifikasi ini adalah berlangsungnya pemadatan larutan

karena meningkatnya viskositas selama pembekuan, sehingga larutan tersebut seolah-olah menjadi seperti kaca. Sebagai pengganti proses dehidrasi perlahan pada prosedur pembekuan yang konvensional, material yang akan dibekukan dengan vitrifikasi ditempatkan dalam media krioprotektan berkonsentrasi tinggi. Setelah material dicelupkan langsung kedalam nitrogen cair terjadi dehidrasi yang sangat cepat, tidak terbentuk kristal-kristal es intra dan ekstraseluler.

Shaw *et al.* (2000) menggambarkan penyebab kerusakan seluler dan kematian sistem biologis akibat proses pembekuan, seperti yang tertera pada tabel 1 berikut ini :

Tabel. 1. Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan Seluler Dan Kematian Pada Sistem Biologis Akibat Proses Pembekuan.

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

Lipid	Radikal bebas
-------	---------------

Sumber : Shaw *et al.* (2000)

Efek yang merugikan dari vitrifikasi diakibatkan oleh toksisitas dan osmotik *injury* selama sel direndam di dalam krioprotektan berkonsentrasi tinggi, sehingga mempengaruhi kemampuan hidup dari sel tersebut (Naitana *et al.*, 1996 yang dikutip oleh Rimayanti, 2001). Toksisitas dan efek negatif osmose dari larutan vitrifikasi dipengaruhi oleh konsentrasi krioprotektan, waktu, dan temperatur perendaman. Pada umumnya larutan vitrifikasi agak toksik dan karenanya diperlukan manipulasi sel pada temperatur berbeda untuk berbagai perendaman yang disesuaikan dengan tingkatan konsentrasi krioprotektan (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Larutan untuk vitrifikasi memiliki tiga karakteristik penting : larutan itu harus mengandung satu atau lebih krioprotektan konsentrasi tinggi, setiap larutan membutuhkan komponen garam fisiologis dan makromolekul harus ditambahkan untuk meningkatkan kemampuan larutan untuk membeku dengan cepat dan mengalami vitrifikasi (Rall, 1987).

2.7. Krioprotektan

Krioprotektan bertindak sebagai agen pelindung bagi membrana dan organel sel agar terhindar dari kerusakan integritas sel selama proses pembekuan dan pencairan kembali. Krioprotektan merupakan zat kimia non elektrolit yang berfungsi mereduksi pengaruh letal proses perendaman kriopreservasi sel

diantaranya baik yang berupa efek larutan (*solution effects*) maupun pembentukan kristal es ekstra atau intraseluler sehingga dapat menjaga viabilitas sel setelah kriopreservasi (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Apabila sel dipindahkan kedalam medium krioprotektan, akan terjadi pengeluaran air dari dalam sel (eksosmosa) dengan cepat terlebih dahulu dan sel menjadi mengkerut. Krioprotektan bekerja dengan cara difusi masuk ke dalam sel pada saat perendaman sel dalam media krioprotektan. Krioprotektan ini berguna untuk menggantikan air yang keluar dari sel sehingga tidak terjadi pengerutan sel. Dalam mekanisme pembilasan akan terjadi proses terbalik dari mekanisme penambahan krioprotektan. Jika sel yang berisi penuh dengan krioprotektan dipindahkan ke dalam medium transfer yang bebas krioprotektan, maka air akan segera masuk ke dalam sel mengencerkan krioprotektan. Laju pemasukan air ke dalam sel lebih cepat dari pada krioprotektan yang berdifusi keluar sel untuk stabilisasi keseimbangan konsentrasi ekstraseluler. Proses ini sering mengakibatkan sel menggembung dan pecah.

Problem pembilasan krioprotektan ini dapat diatasi dengan pembilasan bertahap atau dengan pemindahan sel ke dalam medium krioprotektan ekstraseluler dengan konsentrasi tinggi misalnya sukrosa 0,5 M (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Berdasarkan perpaduan antara sifat fisika kimia (besar molekul, polaritas, dan koligatif) krioprotektan dengan sifat biologis membran sel yang semi permeabel, krioprotektan terbagi menjadi dua grup :

1. Krioprotektan intraseluler.

Krioprotektan yang dapat keluar masuk melalui membran sel dan biasanya memiliki ukuran molekul yang kecil. Yang termasuk krioprotektan intra seluler adalah gliserol, *dimethylsulfoxide* (DMSO), etilen glikol dan 1,2 propandiol.

2. Krioprotektan ekstraseluler.

Krioprotektan yang tidak dapat menembus membran sel dan memiliki ukuran molekul yang besar. Yang termasuk krioprotektan ini yaitu polivinilpirolidon (PVP), gula dengan molekul besar sukrosa dan rafinosa, protein dan lipoprotein, kuning telur, serum darah dan susu.

Niemann (1991) menjelaskan bahwa tingkat penetrasi krioprotektan intraseluler tergantung dari koefisien permeabilitas sel terhadap masing-masing agen, gradien antara konsentrasi krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler, temperatur dan area permukaan sel. Dikatakan oleh Hozumi (2001) krioprotektan intraseluler memanfaatkan perbedaan tekanan osmosis dan masuk ke dalam sel untuk membantu memberikan perlindungan terhadap sitoplasma. Sedangkan krioprotektan ekstraseluler menimbulkan kondisi dehidrasi intraseluler dengan adanya perbedaan tekanan osmosis sel, tetapi tanpa masuk ke dalam sel.

Disebutkan oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) beberapa fungsi krioprotektan yang diperankan dalam alur mekanisme reaksi preservasi sel diantaranya :

1. Mencegah terbentuknya kristal es.

Krioprotektan memiliki kemampuan pengikatan air yang kuat, oleh karena itu dapat mencegah pengumpulan molekul-molekul H_2O dan mencegah

kristalisasi es pada daerah titik beku larutan. Dengan adanya penurunan titik beku, pengeluaran air dari dalam sel (eksosmosa) baru terjadi pada temperatur yang lebih rendah lagi, sehingga reduksi volume di akhir proses pembekuan dapat berkurang.

2. Proteksi terhadap membran sel.

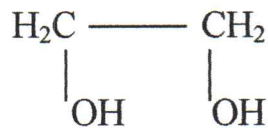
Krioprotektan dapat berinteraksi dengan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat atau mungkin lebih penting lagi ketika kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan (*warming*). Interaksi krioprotektan berupa kelenturan membran, tidak rapuh, sehingga kerusakan irreversibel karena retak dapat diatasi.

3. Menekan laju pengaruh peningkatan konsentrasi

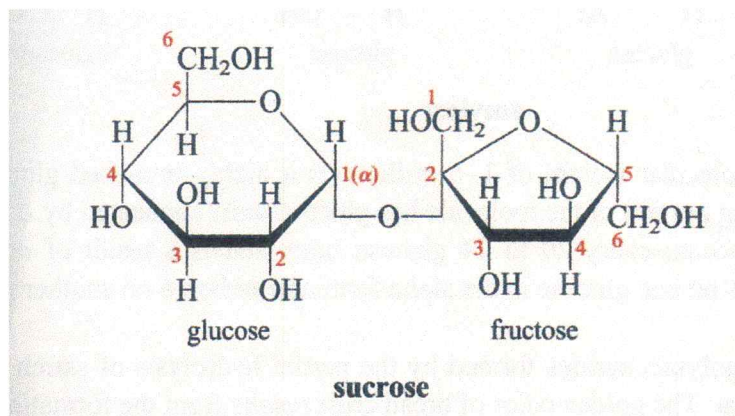
Pada temperatur yang cukup rendah, kristal es akan terbentuk. Kristal es yang terbentuk merupakan awal peningkatan kembali konsentrasi yang diikuti oleh dehidrasi. Dehidrasi akan dihambat dengan adanya krioprotektan yang memiliki sifat daya ikat yang kuat terhadap air. Molekul-molekul solute akan terlarut dalam campuran air dan krioprotektan. Campuran ini dapat mengurangi kerusakan sel jika sel berada dalam larutan berkonsentrasi lebih tinggi tanpa krioprotektan.

Kriteria dari krioprotektan antara lain kelarutan yang tinggi, toksisitas rendah pada konsentrasi yang tinggi dan berat molekul yang rendah keduanya agar mudah menembus dan sebagai usaha dari efek koligatif maksimum (Schneider and Mazur, 1986).

Etilen glikol merupakan larutan dengan toksisitas rendah dan permeabilitas yang tinggi (Sommerfeld and Niemann, 1999; Massip, 2001). Berat molekul etilen glikol adalah 62,07 g/mol dan glukosa adalah 342,30 g/mol (Fieser and Fieser, 1967).



Gambar 1. Gambar Bangun Etilen Glikol
(Sumber : Wilbraham dan Matta, 1992)



Gambar 2. Gambar Bangun Sukrosa
(Sumber : Bloomfield and Stephens, 1996)

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya selama tiga bulan terhitung bulan Februari 2002 sampai dengan bulan April 2002.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Penelitian

Hewan penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb C yang berumur 3 - 4 bulan sebanyak 30 ekor dan mencit (*Mus musculus*) jantan strain Balb C yang berumur 3 - 4 bulan sebanyak 10 ekor.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian adalah : hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) (Intervet), hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) (Intervet), medium *Phosphat Buffer Saline* (PBS) (Gibco USA), *mineral oil* (Squibb), medium M16, *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma), sukrosa, etilen glikol, gentamycin, nitrogen cair dan parafin.

3.2.3. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah : mikroskop *inverted*, *laminar flow*, inkubator CO₂ 5%, lemari es, kontainer, mikro pipet otomatis (Eppendrof), pipet Pasteur (Jerman), gunting mikro, *scalpel*, pinset mikro, becker glass, erlenmeyer, timbangan analitik, *petridish disposable* 35 x 10 (Nuclon), spuit (1cc, 5cc, 10cc) (Terumo), *mini straw* (French *straw*), kandang mencit, serta peralatan habis pakai seperti tissue, kapas , aluminium foil dan lain-lain.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Persiapan Medium Kultur

Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah *Phosphat Buffer Saline* (PBS) untuk koleksi sel telur dan medium M16 untuk fertilisasi *in vitro*.

3.3.2. Koleksi Sel Telur

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) koleksi sel telur dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut : melakukan superovulasi dengan menggunakan hormon PMSG dan HCG, yaitu mencit disuntik secara sub kutan dengan PMSG sebanyak 5 IU, 48 jam kemudian disuntik secara sub kutan dengan HCG sebanyak 5 IU dan mencit langsung dikawinkan dengan pejantan vasektomi (Tada *et al.*, 1993; Rayos *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996).

Tujuh belas jam kemudian mencit betina diambil untuk dilakukan pemanenan sel telur dengan cara mencit dikorbankan kemudian uterus dipreparir

dan tuba Falopii diangkat kemudian dilakukan pembilasan dengan menggunakan PBS. Selanjutnya tuba Falopii diletakkan di cawan petri, untuk dilakukan panen sel telur dibawah mikroskop *inverted*.

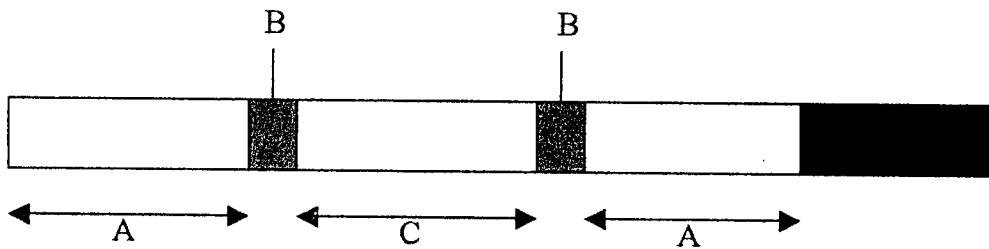
3.3.3. Proses Vitrifikasi dan *Thawing* Sel Telur

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) proses ini dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut. Setelah sel telur hasil panen dicuci dengan larutan PBS, dipindahkan ke cawan petri yang berisi medium vitrifikasi : P0, Perlakuan kontrol (tanpa krioprotektan dan tanpa vitrifikasi) ; P1, Etilen glikol 40% + Sukrosa 0,5 M ; P2, Etilen glikol 20% + Sukrosa 0,5 M ; P3, Etilen glikol 40% + Sukrosa 0,3 M ; P4, Etilen glikol 20% + Sukrosa 0,3 M (Tada *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1993).

Kemudian sel telur direndam di dalam krioprotektan pada suhu ruangan selama 10 menit. Selesai perendaman, sel telur dimasukkan dalam *mini straw* 0,25 cc (French *straw*). Cara pengemasan dilakukan sebagai berikut : pertama-tama dilakukan aspirasi diluen 1 M sukrosa dalam PBS ke dalam *straw* sepanjang 3 cm, kemudian dibuat rongga udara 0,25 cm. Sebanyak 10 – 15 sel telur yang direndam krioprotektan diambil dari cawan petri, lalu diaspirasi sepanjang 3 cm. Setelah itu dipisahkan kembali dengan rongga udara 0,25 cm. Rongga sisanya diisi dengan diluen 1 M sukrosa dalam PBS. Kemudian ditutup dengan parafin.

Segera setelah pengemasan, *mini straw* langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Pada waktu pencelupan atau membenaman (*plunging*), larutan

diluen sukrosa berubah warna seperti susu, sedangkan medium vitrifikasi tetap transparan.



Keterangan :

A : diluen (1 M sukrosa dalam PBS) (panjang sekitar 3 cm)

B : rongga udara (panjang sekitar 0,25 cm)

C. sel telur dalam medium vitrifikasi (panjang sekitar 3 cm)

Gambar 3. Skema Pengemasan Sel Telur Dalam *Straw* Untuk Proses Vitrifikasi (sumber : Supriatna dan Pasaribu, 1992)

Thawing dilakukan dengan mencelupkan *mini straw* dalam sebuah waskom berisi air bersuhu 30°C secara hati-hati.

3.3.4. Koleksi Spermatozoa

Mencit jantan dikorbankan dan diambil kauda epididimisnya. Cuci kauda epididimis dengan medium M16 sebanyak 3 kali (Supriatna dan Pasaribu, 1992; Rayos et al., 1994). Selanjutnya tekan dan jepit kauda epididimis untuk membebaskan spermatozoa (jika sulit, kauda epididimis dapat digunting kecil – kecil). Tambahkan 1 ml medium M16. Kemudian dilakukan inkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 10 menit. Untuk fertilisasi, dosis

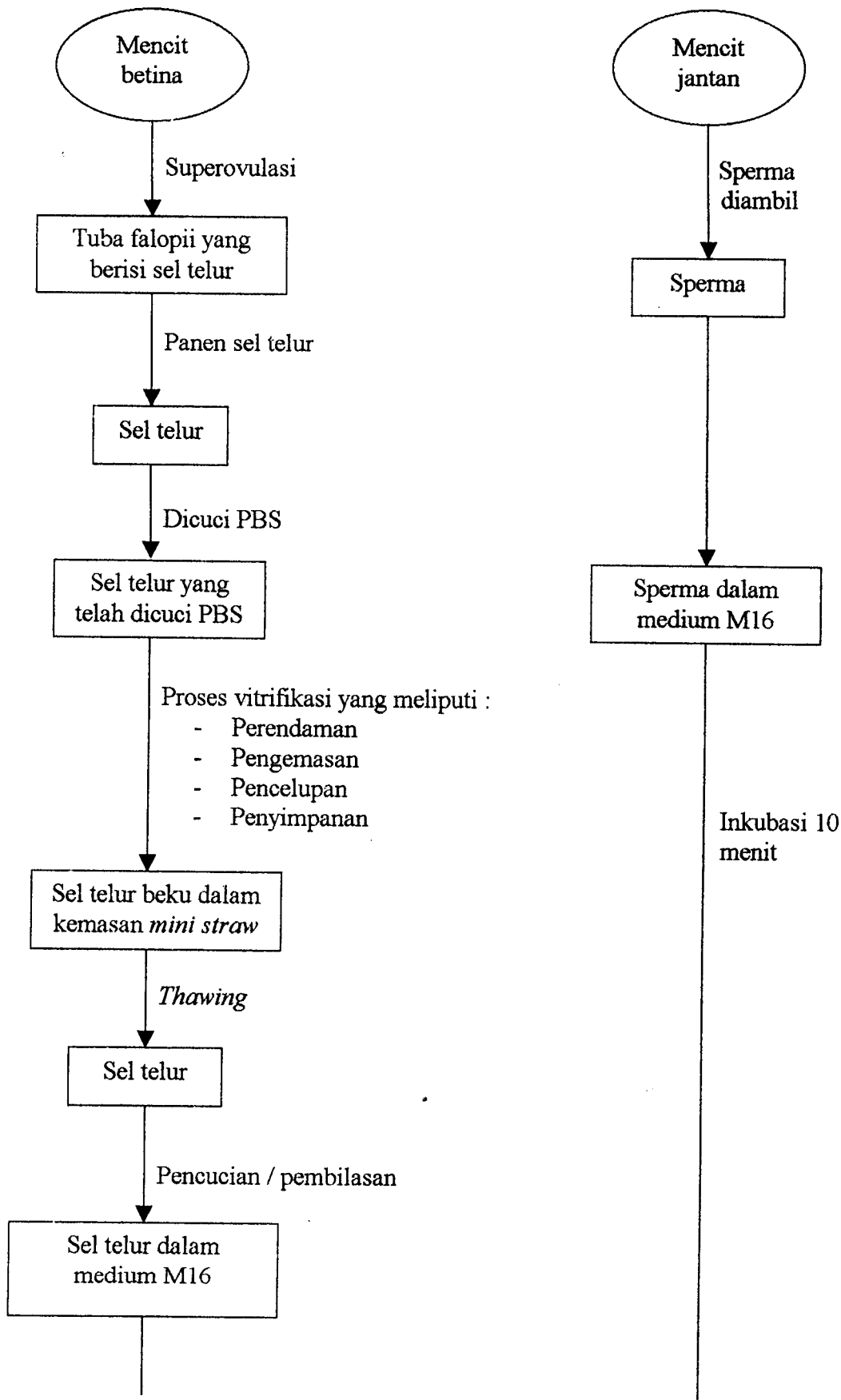
spermatozoa yang diperlukan adalah 0,05 ml campuran tersebut yang setara dengan $1,0 \times 10^6$ spermatozoa (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

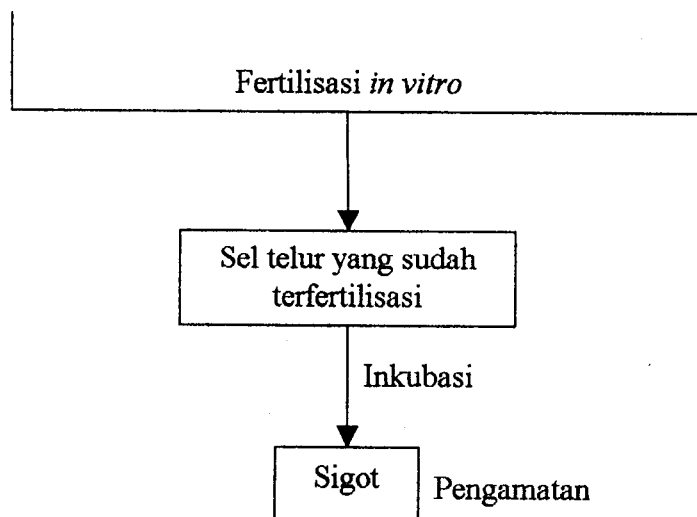
Semen yang dikoleksi ini memiliki gerakan masa : +++ . Gerakan individu spermatozoa adalah progresif. Semen mencit memiliki pH 7, setelah dicampur medium M16 maka pH menjadi 7,2 , sedangkan pH medium yang dianjurkan untuk kultur berkisar antara 7,2 – 7,4 (Freshney, 1986).

3.3.5. Fertilisasi dan Kultur *In Vitro*

Berdasarkan Supriatna dan Pasaribu (1992) proses ini dilakukan melalui tahap - tahap sebagai berikut : setelah *thawing*, *mini straw* diangkat dengan pinset dan dilap dengan kertas hisap. Dengan menggunting tutup bagian bawah (*seal*) dan ujung bagian atas tepatnya dibawah sumbat kapas, maka sel telur dan medianya akan menetes ke bawah yang sudah disiapkan cawan petri berisi 0,5 M sukrosa untuk dicuci, kemudian dicuci dengan medium M16 setelah itu dipindahkan dalam medium fertilisasi.

Sperma dari mencit jantan yang telah dikoleksi diambil sebanyak 1 tetes (0,05 ml) dengan menggunakan pipet yang telah dimodifikasi, kemudian ditanamkan dalam medium fertilisasi (M16) yang telah berisi sel telur, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam.





Gambar 4. Skema Penelitian

3.4. Peubah yang Diamati

Pengamatan angka fertilisasi pada tahap fertilisasi *in vitro* berdasarkan pada terbentuknya sigot.

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk persentase dan dilakukan uji Chi Kuadrat (X^2) (Ronald dan Raymond , 1986). Jika ditemukan perbedaan yang nyata dengan kontrol, perhitungan dilanjutkan dengan Uji Koreksi Kontinuitas Yates untuk mengetahui perlakuan terbaik.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Sel Telur yang Terfertilisasi

Hasil yang didapatkan dari pengamatan pada sel telur mencit yang difertilisasi secara *in vitro* dari perlakuan kontrol, P1, P2, P3, dan P4 dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel. 2. Jumlah Sel Telur Yang Terfertilisasi

Perlakuan	N	Fertilisasi	
		+	-
P0	46	43 (93,48)	3 (6,52)
P1	44	36 (81,82)	8 (18,18)
P2	32	26 (81,25)	6 (18,75)
P3	36	24 (66,67)	12 (33,33)
P4	36	24 (66,67)	12 (33,33)

Keterangan :

1. Angka di dalam tanda kurung adalah persentase fertilisasi.
2. P0 : Kontrol, tanpa krioprotektan dan tanpa vitrifikasi
P1 : Perlakuan dengan etilen glikol 40% + sukrosa 0,5 M
P2 : Perlakuan dengan etilen glikol 20% + sukrosa 0,5 M
P3 : Perlakuan dengan etilen glikol 40% + sukrosa 0,3 M
P4 : Perlakuan dengan etilen glikol 20% + sukrosa 0,3 M
3. + : Jumlah sel telur yang terfertilisasi
- : Jumlah sel telur yang tidak terfertilisasi

Dari hasil uji statistik dengan menggunakan Chi Kuadrat didapat X^2 tabel (0,05) sebesar 11,07 sedangkan X^2 hitung sebesar 16,93. Hal ini berarti X^2 hitung lebih besar dari X^2 tabel, H_0 ditolak, sehingga dapat dinyatakan ada perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi dengan taraf signifikansi 0,05.

Oleh karena itu perhitungan dilanjutkan dengan menggunakan Uji Koreksi Kontinuitas Yates untuk mengetahui perlakuan terbaik dari empat perlakuan yang ada. Perlakuan terbaik adalah perlakuan yang bisa mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau tidak berbeda nyata dengan kontrol. Melalui Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dengan P1 didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi, sehingga H_1 diterima, yang berarti perlakuan P1 dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau sama dengan kontrol. Sedangkan antara P0 dengan P2, P3, dan P4 didapatkan ada perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi jika dibandingkan dengan kontrol, sehingga H_1 ditolak, yang berarti ketiga perlakuan itu tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau sama dengan kontrol.

Persentase angka fertilisasi pada tabel 2 didapatkan bahwa perlakuan yang memberikan angka tertinggi adalah perlakuan P1, kemudian secara berturut-turut P2, P3, dan P4.

4.2. Hasil Pengamatan

Hasil pengamatan uterus mencit *in situ*, sel telur mencit, dan sel telur yang sedang mengalami proses fertilisasi, diperlihatkan pada gambar-gambar yang tersaji berikut ini.

BAB V

PEMBAHASAN

Berdasarkan data hasil penelitian yang kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan metode Chi Kuadrat didapatkan perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi sel telur mencit setelah proses vitrifikasi. Kemudian dilanjutkan dengan analisis Koreksi Kontinuitas Yates dengan cara membandingkan antara tiap perlakuan dengan kontrol.

Melalui analisis ini didapatkan hasil antara P0 dengan P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi jika dibandingkan dengan kontrol, yang berarti ketiga perlakuan itu tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau sama dengan kontrol.

Sedangkan dari analisis antara P0 dengan P1 didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi, yang berarti perlakuan P1 dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau sama dengan kontrol.

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan kerusakan sel pada proses kriopreservasi diantaranya adalah :1). konsentrasi solute intraseluler ataupun tekanan osmose, 2). kristal es intraseluler dan 3). interaksi dari faktor pertama dan kedua. Konsentrasi solute intraseluler dapat menimbulkan defek sel karena adanya pengeluaran ion-ion, perubahan pH, presipitasi protein dan dehidrasi. Dehidrasi yang hebat menyebabkan sel mengkerut. Selain itu dalam pencairan sel telur dengan *warming rate* tinggi dapat menimbulkan kejutan osmotik (*osmotic shock*) yang letal terhadap sel. Air yang berasal dari proses pencairan mengalir cepat ke

bagian dalam sel yang berkonsentrasi tinggi. Sel menggembung dan akhirnya pecah karena tekanan dalam yang besar. Pembentukan kristal es besar dapat merusak organel sel secara mekanis (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Perlakuan P1 medium krioprotektan yang digunakan adalah etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5 M, yang merupakan konsentrasi tertinggi dari keempat perlakuan tersebut. Campuran antara etilen glikol sebagai krioprotektan intraseluler dan sukrosa sebagai krioprotektan ekstraseluler dengan konsentrasi tersebut dapat menghambat kerusakan sel telur yang disebabkan oleh proses vitrifikasi. Krioprotektan dengan konsentrasi ini mencegah terbentuknya kristal es intraseluler sehingga mencegah kerusakan sel. Molekul-molekul air di dalam sel telur keluar dari sel yang kemudian krioprotektan intraseluler masuk ke dalam sel sehingga tidak terjadi pembentukan kristal es intraseluler. Konsentrasi tinggi dari krioprotektan juga tidak menyebabkan efek toksik pada sel telur. Hal ini diduga karena efek toksik selama proses *thawing* dikurangi dengan metode dilusi langsung (Dinnyes *et al.*, 2000).

Penggunaan metode dilusi langsung ini menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) dapat mengatasi problem pembilasan. Dengan cara pemindahan sel telur ke dalam medium krioprotektan ekstraseluler dengan konsentrasi tinggi misalnya sukrosa 0,5 M. Pada perlakuan ini telah digunakan sukrosa 0,5 M sebagai krioprotektan ekstraseluler, sehingga dengan pemindahan ke dalam 0,5 M sukrosa pada saat pembilasan akan menyebabkan konsentrasi krioprotektan ekstraseluler menjadi lebih tinggi. Dalam situasi ini kecenderungan air masuk ke dalam sel untuk mengencerkan krioprotektan intraseluler terimbangi dengan kecenderungan

air meninggalkan sel telur karena konsentrasi sukrosa yang tinggi diluar sel. Sel tidak akan menggembung walaupun dalam satu tahap. Akan tetapi sel embrio akan menyusut ketika krioprotektan dan air meninggalkan sel untuk mencapai keseimbangan konsentrasi medium transfer. Kerusakan karena penyusutan relatif lebih kecil daripada kerusakan karena pecah.

Perlakuan P2, P3 dan P4 menggunakan konsentrasi krioprotektan yang lebih rendah dari perlakuan P1, baik etilen glikol ataupun sukrosa. Konsentrasi yang lebih rendah ini tampaknya tidak cukup untuk melindungi sel telur pada proses vitrifikasi. Hal ini disebabkan karena organel-organel khusus dalam sel telur matang seperti *meiotic spindle*, *cortical granules* dan *cytoskeleton* diyakini rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh pendinginan dan perendaman di dalam krioprotektan. Proses pendinginan sederhana pada sel telur tikus, kambing dan sapi pada 25°C atau 4°C menghasilkan depolimerisasi pada mikrotubulus *spindle*. Meskipun *spindle* terbentuk kembali ketika sel telur tikus dipanaskan dan diinkubasi pada 37°C selama 60 menit, tetapi hal itu tetap saja berpotensi terjadi anomali-anomali genetik yang disebabkan oleh kesalahan pada gerakan kromosom (Rall, 1992; Saunders and Parks, 1999; Shaw *et al.*, 2000). Pada perlakuan ini juga didapatkan degenerasi inti sel telur yang menyebabkan sel telur menjadi rusak.

Martino *et al.* (1999) melaporkan bahwa sel telur pada metafase II sangat sensitif pada proses pendinginan. Mendinginkan sel telur tersebut pada 0°C selama 5 detik secara signifikan mengurangi kemampuan mereka untuk

membelah dan berkembang setelah fertilisasi *in vitro*, setelah 80 detik pada 0°C, hanya 10% dari sel telur itu yang berkembang menjadi stadium blastosit.

Kriopreservasi sel telur juga diduga menyebabkan perubahan struktur pada zona pelusida, yang dinamakan “ *zona hardening* “, yang mengurangi penetrasi spermatozoa dan fertilisasi (Johnson *et al.*, 1988). Hal ini dapat diatasi dengan penambahan serum pada krioprotektan (Wood *et al.*, 1989), namun penambahan serum ini diduga dapat menyebabkan beberapa faktor yang tidak diketahui serta patogen sehingga penggunaan serum masih kontroversial (Rossi *et al.*, 1980).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan :

1. Vitrifikasi sel telur mencit dengan kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa dapat mempertahankan angka fertilisasi secara *in vitro*.
2. Angka fertilisasi tertinggi didapat pada perlakuan P1 dengan konsentrasi kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5 M.

6.2. Saran

Berdasarkan penelitian dan kesimpulan yang didapat, maka penulis menyarankan :

1. Penggunaan kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5 M dapat diaplikasikan untuk melakukan vitrifikasi sel telur pada ternak lain.
2. Untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap tentang vitrifikasi sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan tentang viabilitas embrio setelah dilakukan proses vitrifikasi sel telur serta akibat dari proses vitrifikasi terhadap perubahan genetik.

RINGKASAN

DHANI PRAKOSO. Pengaruh Kombinasi Krioprotektan Etilen Glikol Dan Sukrosa Pada Proses Vitrifikasi Sel Telur Mencit (*Mus musculus*) Terhadap Angka Fertilisasi Secara *In Vitro* (dibawah bimbingan Widjiati, M.Si., drh. dan Kuncoro Puguh S., M.Kes., drh.).

Teknik kriopreservasi embrio tepat untuk transfer embrio karena embrio beku, yang kemudian di *thawing* dapat ditransfer kapanpun ketika resipien tersedia. Akan tetapi kriopreservasi embrio mengalami kendala yang berkaitan dengan masalah etis dan status legal dari embrio. Oleh karena itu fokus penelitian dilakukan terhadap kriopreservasi sel telur betina.

Teknik kriopreservasi dengan metode vitrifikasi memiliki beberapa keuntungan antara lain : lebih mudah dilakukan, efisiensi biaya dan prosedur yang lebih cepat. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa terhadap angka fertilisasi sel telur mencit secara *in vitro*.

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina strain Balb C yang berumur 3 – 4 bulan sebanyak 30 ekor dan mencit jantan dengan umur serta strain yang sama sebanyak 10 ekor. Superovulasi dilakukan dengan cara mencit betina disuntik dengan hormon PMSG sebanyak 5 IU, 48 jam kemudian dengan hormon HCG sebanyak 5 IU dan mencit langsung dikawinkan dengan pejantan vasektomi. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pemanenan sel telur.

Sel telur-sel telur tersebut dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol (P0) serta 4 kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4). Kelompok kontrol (P0) tidak dilakukan perendaman pada kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa serta tidak dilakukan vitrifikasi tetapi langsung dilakukan fertilisasi *in vitro*. Kelompok perlakuan P1 menggunakan kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5 M; P2 menggunakan etilen glikol 20% dan sukrosa 0,5 M; P3 menggunakan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,3 M; serta P4 menggunakan etilen glikol 20% dan sukrosa 0,3 M. Kelompok perlakuan ini kemudian dilakukan vitrifikasi setelah itu di *thawing* yang kemudian dilanjutkan dengan fertilisasi *in vitro*.

Persentase fertilisasi yang didapat dari masing-masing perlakuan adalah 93,48% pada P0; 81,82% pada P1; 81,25% pada P2; 66,67% pada P3 dan 66,67% pada P4. Data ini kemudian dianalisis dengan menggunakan Chi Kuadrat. Kesimpulan yang didapat adalah pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol dan sukrosa dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi atau sama dengan kontrol pada perlakuan P1.

Perlakuan P2, P3 dan P4 tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi tetap tinggi kemungkinan disebabkan oleh adanya kerusakan pada organel-organel khusus seperti *meiotic spindle*, *cortical granules* dan *cytoskeleton* yang rentan terhadap proses pendinginan dan perendaman di dalam krioprotektan.

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk mengaplikasikan kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% dan sukrosa 0,5 M untuk melakukan vitrifikasi sel telur pada ternak lain, melakukan penelitian lanjutan tentang viabilitas embrio

setelah dilakukan proses vitrifikasi serta penelitian tentang akibat dari proses vitrifikasi terhadap perubahan genetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1999. Applied Animal Reproduction. 3rd .ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.pp: 86,137,213,220.
- Bloomfield, M.M. and L.J. Stephen. 1996. Chemistry And The Living Organism. 6th .ed. John Wiley & Sons Inc.p: 391.
- Chemineau, Ph., D. Chupin, Y. Cognat and J. Thimonier. 1993. Control of Reproduction in Domestic Mammals. In: C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter (Ed.). Reproduction In Mammals And Man. Ellipse. Paris.p: 673-675.
- Coticchio, G., S. Garetti, M.A. Bonu and A. Borini. 2001. Cryopreservation of human oocytes. J. Hum. Fertil. 4 : 152-157.
- Dinnyes, A., Y. Dai, S. Jiang and X. Yan. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. J. Biol. of Reprod. 63 : 513-518.
- Enders, A.C. 1970. Fertilization, Cleavage and Implantation. In: E.S.E. Hafez (Ed.). Reproduction And Breeding Techniques For Laboratory Animals. Lea & Febiger. Philadelphia.p: 137.
- Fieser, L.F. and M. Fieser. 1967. Reagents for Organic Synthesis. John Wiley & Sons Inc.p: 375.
- Freshney, R.I. 1986. Introduction : Principles of Sterile Technique and Cell Propagation. In: R.I. Freshney (Ed.). Animal Cell Culture. A Practical Approach. IRL Press.p: 7.
- Friedler, S., L.C. Giudice and E.J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. J. Fertil. Steril.. 49 : 743-764.
- Gilbert, S.F. 1988. Developmental Biology 2nd .ed. Sinaver Associates Inc. Publisher Sunderland. Massachusetts.p: 24.
- Hardjopranjoto, S. 1987. Pembuahan In Vitro dan Transfer Embrio. Pidato Pengukuhan Guru Besar. Universitas Airlangga. Surabaya.p: 3-12.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.p: 37.

- Hozumi, T. 2001. Reproductive Biology and Biotechnology. Japan International Cooperation Agency. Indonesia. p: 47.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi Dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit ITB Bandung dan Penerbit Universitas Udayana.pp: 5,83,117,259,268,272-274.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. edisi kedua. Laboratorium Fisiologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.pp: 30-87.
- Johnson, M.H. and S.J. Pickering, and M.A. George. 1988. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. J. Hum. Reprod. 3 : 383-387.
- Kobayashi, K., H. Nagashima, H. Yamakawa, Y. Kato and S. Ogawa. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. J. Theriog. 33 : 777-788.
- Martino, A., N. Songsasen and S.P. Leibo. 1996. Development into blastocyst of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. J. Biol. of Reprod. 54 : 1059-1069.
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. J. Reprod. Domest. Anim. 36 : 49-55.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock : current status and research needs. J. Theriog. 35 : 109-124.
- Okada, A., K. Yoshi, Y. Mizuochi, T. Andoh, S. Joujou, S. Wachi, M. Togawa, N. Ishida, M. Asada and Y. Fukui. 2002. Viability of cryopreserved and vitrified embryos and fertility after direct transfer in ewes. J. Reprod. Dev. 48 : 189-195.
- Parks, J.E. and N.A. Ruffing. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. J. Theriog. 37 : 59-73.
- Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. J. Cryobiol. 24 : 387-402.
- Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos : methods and applications. J. Anim. Reprod. Sci. 28 : 237-245.
- Rayos, A.A., Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. J. Reprod. and Fertil. 100 : 123-129.

- Rimayanti. 2001. Viabilitas Oosit Sapi Setelah Proses Vitrifikasi Dengan Krioprotektan Yang Berbeda. Thesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya. p: 27.
- Ronald, E.W. dan H.M. Raymond. 1986. Ilmu Peluang Dan Statistika Untuk Insinyur Dan Ilmuwan. Cet. III. Penerbit ITB. Bandung. p: 284-287.
- Rossi, C.R., C.R. Bridgman and G.K. Kiesel. 1980. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.* 41 : 1680-1681.
- Salisbury, G.W. dan N.L. VanDemark. 1985. Fisiologi Reproduksi Dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. p: 237.
- Saunders, K.M. and J.E. Parks. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *J. Biol. of Reprod.* 61 : 178-187.
- Schneider, U. and P. Mazur. 1986. Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing. In: D.A. Morrow (Ed.). *Current Therapy In Theriogenology*. W.B. Saunders Company. p: 82.
- Seidel Jr., G.E. 1986. Genetic engineering. In: D.A. Morrow (Ed.). *Current Therapy In Theriogenology*. W.B. Saunders Company. p: 88.
- Shaw, J.M., A. Oranratnachai and A.O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *J. Theriog.* 53 : 59-72.
- Sommerfeld, V. and H. Niemann. 1999. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *J. Cryobiol.* 38 : 95-105.
- Supriatna, I. dan Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio Dan Pembekuan Embrio. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. pp: 1-35, 105-143.
- Tada, N., M. Sato, E. Amann and S. Ogawa. 1993. A simple and rapid method for Cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification : beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *J. Theriog.* 40 : 333-344.
- Tripodi, A., E. Sturlese and F. Cremonesi. 2001. Cryopreservation of oocytes after vitrification. *J. Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 28 : 157-162.

- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos in vitro. *J. Anim. Reprod. Sci.* 28 :125-137.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *J. Anim. Reprod. Sci.* 2 : 357-364.
- Wilbraham, A.C. dan M.S. Matta. 1992. Pengantar Kimia Organik Dan Hayati. Penerbit ITB. Bandung. p: 65.
- Wood, M.J., J. Carroll and D.G. Whittingham. 1989. The addition of serum to the medium limits zona hardening in frozen oocytes. *J. Reprod. Fertil.* (Abstr.). Ser. No.3. p:33.
- Zhu, S.E., M. Kasai, H. Otoge, T. Sakurai and T. Machida. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocyst by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. and Fertil.* 98 : 139-145.
- Zhu, S.E., T. Sakurai, K. Edashige, T. Machida and M. Kasai. 1996. Cryopreservation of zona-hatched mouse blastocyst. *J. Reprod. and Fertil.* 107 : 37-42.

Lampiran 1 : Data Jumlah Sel Telur Yang Terfertilisasi

Perlakuan	N	Fertilisasi	
		+	-
P0	46	43 (93,48)	3 (6,52)
P1	44	36 (81,82)	8 (18,18)
P2	32	26 (81,25)	6 (18,75)
P3	36	24 (66,67)	12 (33,33)
P4	36	24 (66,67)	12 (33,33)

Keterangan :

1. Angka di dalam tanda kurung adalah persentase fertilisasi.
2. P0 : Kontrol, tanpa krioprotektan dan tanpa vitrifikasi
P1 : Perlakuan dengan etilen glikol 40% + sukrosa 0,5 M
P2 : Perlakuan dengan etilen glikol 20% + sukrosa 0,5 M
P3 : Perlakuan dengan etilen glikol 40% + sukrosa 0,3 M
P4 : Perlakuan dengan etilen glikol 20% + sukrosa 0,3 M
3. + : Jumlah sel telur yang terfertilisasi
- : Jumlah sel telur yang tidak terfertilisasi

$$E (+) = \frac{43 + 36 + 26 + 24 + 24}{5}$$

$$= 30,6$$

$$E (-) = \frac{3 + 8 + 6 + 12 + 12}{5}$$

$$= 8,2$$

$$\begin{aligned}
X^2 \text{ hitung} &= \frac{(43 - 30,6)^2}{30,6} + \frac{(36 - 30,6)^2}{30,6} + \frac{(26 - 30,6)^2}{30,6} \\
&\quad + \frac{(24 - 30,6)^2}{30,6} + \frac{(3 - 8,2)^2}{8,2} + \frac{(8 - 8,2)^2}{8,2} \\
&\quad + \frac{(12 - 8,2)^2}{8,2}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &= 5,03 + 0,95 + 0,69 + 1,42 + 1,42 + 3,30 + 4,88 \cdot 10^{-3} + 0,59 + 1,76 \\ &\quad + 1,76 \\ &= 16,93 \end{aligned}$$

$$X^2 \text{ tabel } (0,05) = 11,07$$

$X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel } (0,05)$ berarti H_0 ditolak. Jadi terdapat perbedaan yang nyata terhadap angka fertilisasi sel telur mencit yang dikultur secara *in vitro*.

Keterangan :

1. E = nilai harapan
2. X^2 = nilai Chi kuadrat

Lampiran 2. Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P1

N	+	-	Σ
P0	43 ^{39,5}	3 ^{5,5}	46
P1	36 ^{39,5}	8 ^{5,5}	44
Σ	79	11	90

$X^2 \text{ tabel } (0,05) = 3,84$

$$\begin{aligned}
 X^2 \text{ hitung} &= \left(\frac{|43 - 39,5| - 0,5}{39,5} \right)^2 + \left(\frac{|36 - 39,5| - 0,5}{39,5} \right)^2 + \left(\frac{|3 - 5,5| - 0,5}{5,5} \right)^2 \\
 &\quad + \left(\frac{|8 - 5,5| - 0,5}{5,5} \right)^2 \\
 &= 0,23 + 0,41 + 1,64 + 0,73 \\
 &= 3,01
 \end{aligned}$$

$X^2 \text{ hitung} < X^2 \text{ tabel } (0,05)$, H_1 diterima sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% + sukrosa 0,5 M dapat mempertahankan angka fertilisasi.

Lampiran 3. Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P2

N	+	-	Σ
P0	43 ^{34,5}	3 ^{4,5}	46
P2	26 ^{34,5}	6 ^{4,5}	32
Σ	69	9	78

$X^2 \text{ tabel } (0,05) = 3,84$

$$\begin{aligned}
 X^2 \text{ hitung} &= \left(\frac{|43 - 34,5| - 0,5}{34,5} \right)^2 + \left(\frac{|26 - 34,5| - 0,5}{34,5} \right)^2 + \left(\frac{|3 - 4,5| - 0,5}{4,5} \right)^2 \\
 &\quad + \left(\frac{|6 - 4,5| - 0,5}{4,5} \right)^2 \\
 &= 1,86 + 2,35 + 0,89 + 0,22 \\
 &= 5,32
 \end{aligned}$$

$X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel } (0,05)$, H_1 ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol 20% + sukrosa 0,5 M tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi.

Lampiran 4. Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P3

N	+	-	Σ
P0	43 ^{33,5}	3 ^{7,5}	46
P3	24 ^{33,5}	12 ^{7,5}	36
Σ	67	15	82

$$X^2 \text{ tabel } (0,05) = 3,84$$

$$\begin{aligned}
 X^2 \text{ hitung} &= \left(\frac{|43 - 33,5| - 0,5}{33,5} \right)^2 + \left(\frac{|24 - 33,5| - 0,5}{33,5} \right)^2 + \left(\frac{|3 - 7,5| - 0,5}{7,5} \right)^2 \\
 &\quad + \left(\frac{|12 - 7,5| - 0,5}{7,5} \right)^2 \\
 &= 2,42 + 2,99 + 3,33 + 2,13 \\
 &= 10,87
 \end{aligned}$$

$X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel } (0,05)$, H_1 ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol 40% + sukrosa 0,3 M tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi.

Lampiran 5. Uji Koreksi Kontinuitas Yates antara P0 dan P4

N	+	-	Σ
P0	43 ^{33,5}	3 ^{7,5}	46
P4	24 ^{33,5}	12 ^{7,5}	36
Σ	67	15	82

$$X^2 \text{ tabel } (0,05) = 3,84$$

$$\begin{aligned}
 X^2 \text{ hitung} &= \left(\frac{|43 - 33,5| - 0,5}{33,5} \right)^2 + \left(\frac{|24 - 33,5| - 0,5}{33,5} \right)^2 + \left(\frac{|3 - 7,5| - 0,5}{7,5} \right)^2 \\
 &\quad + \left(\frac{|12 - 7,5| - 0,5}{7,5} \right)^2 \\
 &= 2,42 + 2,99 + 3,33 + 2,13 \\
 &= 10,87
 \end{aligned}$$

$X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel } (0,05)$, H_0 ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi krioprotektan etilen glikol 20% + sukrosa 0,3 M tidak dapat mempertahankan angka fertilisasi.

Lampiran 6. Pengenceran Hormon**1. Pengenceran PMSG**

Dalam 1 vial hormon terdapat 1000 IU PMSG

1000 IU PMSG + 5 ml pelarut $\longrightarrow$ 1 ml larutan 200 IU PMSG

200 IU PMSG + 3 ml pelarut $\longrightarrow$ 1 ml larutan 50 IU PMSG

0,1 ml larutan 5 IU PMSG

2. Pengenceran HCG

Dalam 1 vial hormon terdapat 1500 IU HCG

1500 IU HCG + 5 ml pelarut $\longrightarrow$ 1 ml larutan 300 IU HCG

300 IU HCG + 5 ml pelarut $\longrightarrow$ 1 ml larutan 50 IU HCG

0,1 ml larutan 5 IU HCG

Lampiran 7. Komposisi Medium M16

Bahan :	Jumlah :
NaCl	5,333 g/l
KCl	0,356 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,252 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,293 g/l
NaHCO ₃	2,101 g/l
Na Laktat 60%	2840 µl
Na Piruvat	0,036 g/l
Glukosa	1,000 g/l
Bovine Serum Albumin	4000 g/l
Penicillin	0,060 g/l
Streptomycin	0,050 g/l
Fenol Red	0,010 g/l
Deionized water	ad 1 liter

Lampiran 8. Komposisi PBS

Bahan: Jumlah:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 132 mg

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 121 mg

Sebagai larutan pertama dicampur menjadi 200 ml dalam aquadest

NaCl 8000 mg

KCl 200 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1150 mg

KH_2PO_4 200 mg

Glukosa 1000 mg

Na Piruvat 36 mg

Streptomycin Sulfat 50 mg

Na-Penicillin-G 61 mg

Sebagai larutan kedua dicampur menjadi 800 ml dalam aquadest.

Jika akan dipakai maka larutan 1 dan 2 dicampur menjadi satu.

Lampiran 9. Krioprotektan**1. Etilen Glikol** (Reagent, Chemical Diagnostic, Merck Catalogue)

Rumus Kimia : $C_2H_6O_2$

Berat Molekul : 62,07 g/mol

Berat Jenis : 1,11 kg/l

40% Etilen glikol = 40 ml Etilen glikol + 60 ml PBS

20% etilen glikol = 20 ml Etilen glikol + 80 ml PBS

2. Sukrosa (Reagent, Chemical Diagnostic, Merck Catalogue)

Rumus Kimia : $C_{12}H_{22}O_{11}$

Berat Molekul : 342,3 g/mol

Berat Jenis : 1970 g/l

0,5 M Sukrosa = $0,5 \times 342,3$ (BM Sukrosa)

= 171,15 g/l PBS

= 17,115 g/100 ml PBS

0,3 M Sukrosa = $0,3 \times 342,3$ (BM Sukrosa)

= 102,69 g/l PBS

= 10,269 g/100 ml PBS