

- FERTILIZATION IN VITRO
- SERUM ABLN - Perpustakaan Unair

SKRIPSI

PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK DAN NON EKSTRAK SERUM KUDA BUNTING PADA MEDIA PEMATANGAN TERHADAP PEMBUAHAN *IN VITRO* PADA SAPI

KH 71/06

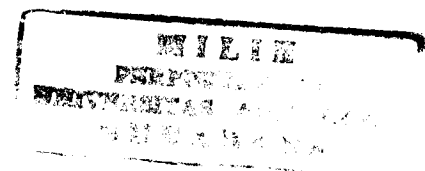
Mon
P



Oleh :

VIKHADENA MAHARANI
BALIKPAPAN – KALIMANTAN TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005



**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK DAN *NON* EKSTRAK SERUM
KUDA BUNTING PADA MEDIA PEMATANGAN TERHADAP
PEMBUAHAN *IN VITRO* PADA SAPI**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga


oleh

VIKHADENA MAHARANI

NIM. 060012734

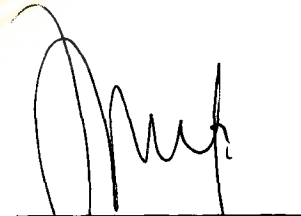
Menyetujui,

Komisi Pembimbing



Pembimbing Pertama

(Prof. Dr. Laba Mahaputra, M. Sc. drh)



Pembimbing Kedua

(Mufasirin, M. Si, drh)

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,



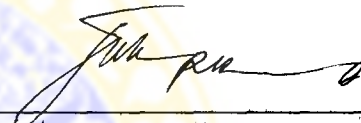
Tri Wahyu Suprayogi, M. Si., drh

Ketua



Hermin Ratnani, M. Kes., drh

Sekretaris



Tjuk Imam Restiadi, M. Si., drh

Anggota



Prof. Dr. Laba Mahaputra M. Sc., drh

Anggota



Mufasirin, M. Si., drh

Anggota

Surabaya, 15 Juli 2005

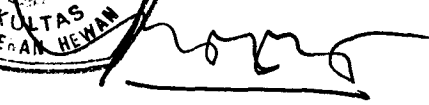


Surabaya, 15 Juli 2005

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

Universitas Airlangga

Dekan,



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

NIP. 130687297

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK DAN *NON* EKSTRAK SERUM
KUDA BUNTING PADA MEDIA PEMATANGAN TERHADAP
PEMBUAHAN *IN VITRO* PADA SAPI**

Vikhadena Maharani

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda dengan umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan sebagai media pematangan terhadap pembuahan *in vitro* dan untuk mengetahui rata-rata yang paling baik dari tiap perlakuan terhadap pembuahan *in vitro*.

Serum kuda didapatkan dengan mengambil darah kuda pada umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan melalui vena jugularis, dan masing-masing diambil 1 ml untuk ditempatkan dalam dua tabung gelas. Setiap tabung diekstraksi menggunakan methanol dan dilakukan *blowing up*. Oosit dikoleksi melalui aspirasi ovarium sapi yang didapat dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Maturasi oosit dilakukan dalam media pematangan TCM-199 + ekstrak serum 2,5 bulan (a_0b_0), TCM-199 + *non* ekstrak serum 2,5 bulan (a_0b_1), TCM-199 + ekstrak serum 3,5 bulan (a_1b_0) dan TCM-199 + *non* ekstrak serum 3,5 bulan (a_1b_1). Setelah inkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 38,5 °C oosit matang siap dibuahi. Pengamatan hasil pembuahan dilakukan 48 jam setelah pembuahan.

Parameter yang diamati adalah rata-rata jumlah embrio hasil pembelahan. Analisis data menggunakan sidik ragam, rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Faktorial. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya peningkatan rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* setelah penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting. Rata-rata jumlah embrio tertinggi ditunjukkan pada perlakuan a_1b_0 .

KATA PENGANTAR

Puji syukur Kehadirat Allah SWT, atas segala berkat, rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan makalah ini.

Adapun tujuan dari penyusunan makalah ini adalah untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Rasa hormat dan terima kasih selalu penulis sampaikan kepada Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Kepada Bapak Prof. Dr. Laba. Mahaputra, M. Sc., drh selaku pembimbing pertama dan Bapak Mufasirin, M. Si., drh selaku pembimbing kedua serta semua dosen penguji yaitu Bapak Tri Wahyu Suprayogi, M. Si, drh, Ibu Hermin Ratnani, M. Kes., drh dan Bapak Tjuk Imam Restiadi, M. Si., drh atas segala kesabaran, saran dan bimbingannya yang sangat membantu dalam penulisan makalah skripsi ini.

Terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh staf Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas segala bantuan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian.

Penulis juga ingin selalu menyampaikan terima kasih kepada Papa, Mama, Mbak Yiyin (almh.) semoga selalu diterima disisi-Nya, Mas Indra dan Mas Oon tercinta atas semua semangat, kasih sayang, dorongan moril dan materil. Teman teman terdekat, Meytha, Tika, Rere, Hadi, Wawan terima kasih bantuan tenaga

Semoga Allah SWT senantiasa melindungi, melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Penulis berharap agar makalah ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharap segala kritik dan saran bagi kesempurnaan makalah ini.

Surabaya, Juli 2005

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Landasan Teori	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	6
1.6. Hipotesis	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Ekstraksi.....	7
2.2. Oogenesis.....	8
2.3. Pembuahan.....	10
2.4. Pembuahan <i>In Vitro</i>	12
2.5. Perkembangan Embrio.....	14
2.6. Media Perkembangan Oosit dan Embrio	16
2.7. <i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG)</i>	18
BAB III. MATERI DAN METODE	20

2.7. <i>Pregnant Mare 's Serum Gonadotropin (PMSG)</i>	18
BAB III. MATERI DAN METODE	20
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2. Materi Penelitian	20
3.2.1. Bahan Penelitian	20
3.2.2. Alat-alat Penelitian	20
3.3. Metode Penelitian	21
3.3.1. Pengambilan Serum Darah.....	21
3.3.2. Pembuatan Ekstrak Serum Kuda Bunting.....	22
3.3.3. Koleksi Oosit.....	22
3.3.4. Maturasi Oosit.....	23
3.3.5. Kapasitas Spermatozoa	24
3.3.6. Pembuahan <i>In Vitro</i>	25
3.3.7. Rancangan Penelitian.....	27
3.3.8. Analisis Data	27
BAB IV. HASIL PENELITIAN	28
BAB V. PEMBAHASAN.....	30
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	34
6.1. Kesimpulan	34
6.2. Saran	34
RINGKASAN	35
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	41

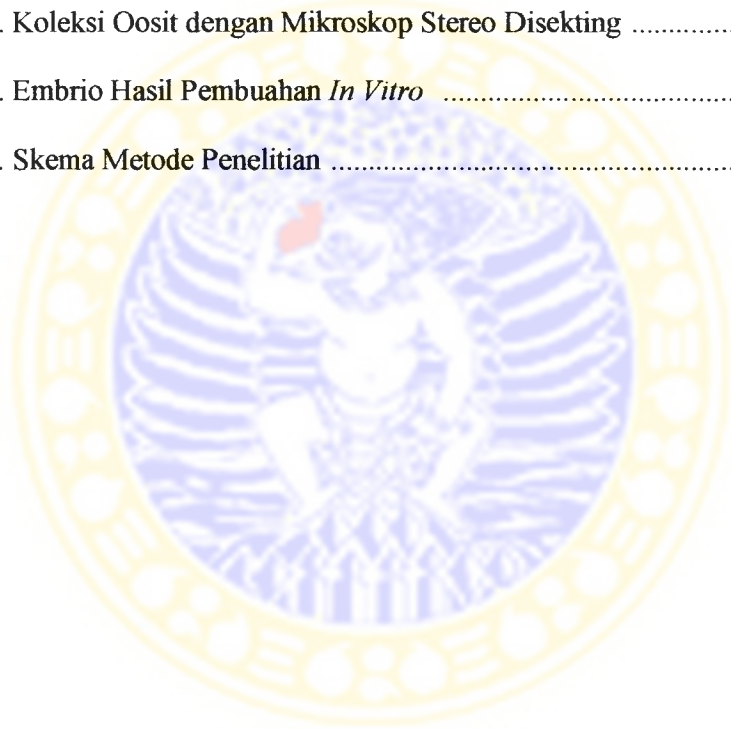
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Tahap Perkembangan Embrio Normal pada Sapi	15
Tabel 2. Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i> Setelah Ditransformasi \sqrt{y}	28



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Penetrasi Spermatozoa	12
Gambar 2. Pembuatan Ekstrak.....	22
Gambar 3. Aspirasi Oosit dari Ovarium	23
Gambar 4. Koleksi Oosit dengan Mikroskop Stereo Disekting	23
Gambar 5. Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i>	25
Gambar 6. Skema Metode Penelitian	26



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data Jumlah Oosit yang Dibuahi, Embrio yang Dihasilkan dan Persentase Jumlah Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i> ..	42
Lampiran 2. Transformasi Arcsin \sqrt{y} Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i>	43
Lampiran 3. Total untuk Tiap Perlakuan Umur Serum Kuda Bunting dan Perlakuan Ekstrak dan <i>Non</i> Ekstrak.....	44
Lampiran 4. Hasil Sidik Ragam Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i>	46
Lampiran 5. Hasil Uji BNT Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan <i>In Vitro</i> Akibat Pengaruh Umur Serum Kuda Bunting	47
Lampiran 6. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Media Pencuci Oosit	48
Lampiran 7. Cara Pembuatan Stok Media TC-199 dalam 1000 ml	49
Lampiran 8. Komposisi dan Cara Pembuatan Media EBBS Stok	50

BAB I

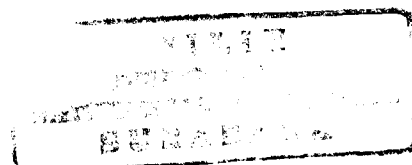
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Salah satu tujuan pembangunan peternakan di Indonesia adalah meningkatkan populasi dan produksi ternak. Dalam upaya memenuhi tujuan tersebut, maka perkembangan peternakan perlu mendapat perhatian yang serius apabila dikaitkan dengan perbaikan gizi masyarakat. Diharapkan dengan peningkatan produksi ternak maka akan meningkatkan konsumsi protein hewani seperti telur, daging dan susu oleh masyarakat.

Dalam rangka menunjang usaha peternakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi terutama sebagai upaya menyediakan ternak dengan kualitas dan kuantitas yang memadai, banyak teknik yang dikembangkan. Salah satu teknik yang aktual akhir-akhir ini adalah Transfer Embrio (TE). Transfer Embrio mempunyai pengertian suatu rangkaian prosedur teknik yang diperlukan untuk memindahkan embrio dari satu induk sebagai donor ke induk lain sebagai resepien (Rodiah, 1996). Salah satu cara untuk mendapatkan embrio yang berkualitas baik dalam jumlah yang besar adalah dengan cara mengembangkan teknologi fertilisasi *in vitro* atau pembuahan *in vitro*.

Pembuahan *in vitro* adalah suatu teknik untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh induk betina. Pengembangan teknologi pembuahan *in vitro* sangat mendukung untuk usaha pengadaan embrio dalam jumlah tidak terbatas di masa yang akan datang dengan biaya operasional yang murah. Walaupun dalam



teknik lebih rumit, tetapi memiliki keunggulan tersendiri yaitu dapat memanfaatkan kembali ovarium hasil samping Rumah Potong Hewan (RPH) menjadi lebih bermanfaat sekaligus memperlambat penurunan populasi ternak (Mahaputra, 2002). Menurut Tappa *et al.* (1994) yang dikutip Dasrul (1997), pelaksanaan pembuahan *in vitro* ini dimulai dari proses pematangan oosit, kapasitas spermatozoa, pembuahan dan pemupukan embrio dalam media biakan, dengan teknik pembuahan *in vitro* akan didapatkan embrio secara masal dan seragam.

Banyak faktor yang mempengaruhi proses *in vitro* diantaranya adalah keadaan lingkungan dalam medium yang digunakan, perlakuan oosit saat pematangan, perlakuan spermatozoa saat kapasitas dan pembiakan embrio setelah pembuahan (Keefer *et al.*, 1993).

Pada proses pematangan oosit maupun perkembangan embrio *in vitro*, media yang digunakan harus mempunyai fungsi mekanis, fisis dan kimiawi, artinya media dapat memberikan lingkungan yang optimum untuk menjamin kelangsungan hidup oosit. Salah satu faktor yang mempengaruhi hasil pematangan oosit secara *in vitro* adalah suhu transport ovarium yang terlalu rendah atau terlalu tinggi sebagai proses pematangan akhir (kapasitas) tidak secara sempurna (Hyttel *et al.*, 1997).

Untuk memaksimalkan hasil maturasi oosit dalam fertilisasi *in vitro*, akhir-akhir ini banyak pakar menambahkan serum, hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam medium maturasi, baik secara mandiri maupun bersamaan (Younis *et al.*, 1989). Serum selain memiliki kelengkapan protein juga

mengandung hormon, faktor penumbuh, enzim, glukosa dan zat organik lainnya dalam konsentrasi tertentu yang berperan dalam penyempurnaan maturasi oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio ke tahap blastosis. Kandungan glukosa yang tinggi dalam serum dapat menghambat perkembangan dini embrio (Keefer *et al.*, 1993). Banyak peneliti menambahkan hormon gonadotropin seperti *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), *Luteinizing Hormone* (LH) pada media maturasi dan fertilisasi oosit dan menghasilkan angka maturasi yang lebih baik.

Hormon *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) yang didapatkan dari serum kuda bunting merupakan hormon *non pituitary gonadotropin* yang dapat digunakan sebagai suplemen media karena mempunyai efek biologis seperti FSH dan sedikit LH. Pertimbangan lain karena PMSG mudah didapatkan dipasaran dengan harga lebih murah daripada preparat gonadotropin seperti FSH dan LH (Restiadi, 1999).

Younis *et al.* (1991) membuktikan bahwa penambahan FSH atau LH dalam media TC-199 pada proses *in vitro maturation* menghasilkan peningkatan yang nyata pada tingkat maturasi. Hal ini dibuktikan pada penelitian Restiadi (1997) dengan penambahan hormon PMSG 5 IU, 10 IU dan serum kuda bunting 5% dan 10% pada media maturasi TC-199 dapat meningkatkan angka maturasi dan angka pembelahan *in vitro* oosit kambing.

Dari latar belakang penelitian mengenai kegunaan hormon PMSG maka ingin diketahui pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan terhadap pembuahan *in vitro* pada sapi.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan suatu masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan terhadap pembuahan oosit *in vitro* pada sapi ?
2. Apakah ada perbedaan penambahan ekstrak serum kuda, umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan pada angka pembuahan oosit *in vitro* pada sapi ?

1.3. Landasan Teori

Bangsa *equidae* (kuda, kuldi zebra) pada saat kebuntingan menghasilkan *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) yang disebut sebagai hormon *non pituitary gonadotropin*. Gonadotropin ini sumbernya bukan berasal dari kelenjar hipofisa. Dibentuk oleh mangkok-mangkok endometrium di kornua uteri bunting yang memproduksi hormon PMSG atau *Equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) (Arthur *et al.*, 1989).

Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) tidak terdapat dalam urine, menunjukkan bahwa molekul-molekul PMSG jauh lebih besar dan tidak dapat melampaui sistem filtrasi ginjal. Secara biologik mempunyai fungsi dan daya kerja serupa dengan campuran FSH dan LH dari kelenjar hipofisa anterior tetapi pengaruh utamanya lebih menyerupai FSH (Hardjopranto, 1984). Seperti FSH, hormon PMSG dapat merangsang pertumbuhan folikel ovarium serta meningkatkan kadar estrogen dalam darah, sedangkan seperti LH, hormon PMSG dapat mendorong terjadinya ovulasi dan merangsang pertumbuhan sel-sel luteum

(Hardjopranjoto, 1984), sehingga hormon ini secara komersial dapat digunakan untuk mendorong terjadinya superovulasi pada transfer embrio, menggerakkan birahi dan mendorong terjadinya superovulasi pada hewan-hewan yang mengalami gangguan reproduksi, serta dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovasikan (Bindon dan Piper, 1981).

Beberapa faktor pembentuk lingkungan yang sesuai untuk pematangan oosit adalah kandungan gonadotropin, faktor penumbuh, hormon steroid, faktor-faktor yang disekresikan oleh sel-sel kumulus dan molekul-molekul yang belum diketahui (Mahaputra dan Mustofa, 2002).

Hormon PMSG dapat digunakan sebagai suplemen media pematangan oosit (*maturation*), media pembuahan (*fertilization*), dan kultur *in vitro* sebagai pengganti *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Penambahan gonadotropin dalam medium pematangan, umumnya dilakukan dalam upaya membuat proses pematangan lebih efektif dan keberadaan gonadotropin ini akan meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus, yang pada gilirannya meningkatkan kapasitas spermatozoa dan proses fertilisasi *in vitro*. Hormon steroid dapat meningkatkan pemakaian protein dalam proses pendewasaan sel telur *in vitro* (Rodiah, 1996).

1.4. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting terhadap hasil pembuahan oosit *in vitro*.
2. Mengetahui adanya perbedaan penambahan ekstrak serum kuda, umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan pada angka pembuahan oosit *in vitro* pada sapi.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat terhadap penerapan bioteknologi dalam bidang peternakan khususnya pembuahan *in vitro*. Penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan diharapkan dapat menekan biaya operasional tanpa mengurangi kualitas dan kuantitas embrio yang dihasilkan.

1.6. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh peningkatan rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* akibat penambahan serum kuda bunting terekstraksi dan non ekstraksi.
2. Terjadi perbedaan yang bermakna antara penambahan ekstrak serum kuda pada umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan pada jumlah rata-rata embrio hasil pembuahan *in vitro*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ekstraksi

Definisi secara umum ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengambil sari dari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Anonimus, 1995_a).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksikan zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Voigt, 1994).

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai. Cara ekstraksi ini tergantung pada kandungan bahan atau simplisia yang akan diambil ekstraknya atau sarinya (Anonimus, 1995_b).

Sebagian ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku secara Soxhletasi. Hasil ekstrak biasanya dipekatkan dengan cara penguapan pelarut ekstrak sampai didapat pelarut ekstrak yang tidak mengandung bahan pelarutnya. Untuk memperoleh ekstrak dengan jumlah bahan aktif yang optimal digunakan campuran ethanol-air (Anonimus, 1986; Anonimus, 1993; Voigt, 1994).

Pelarut untuk ekstraksi dikatakan sesuai bila memenuhi syarat yang antara lain mudah dipisahkan dari substansi yang diekstrak dan tidak toksik (Voigt, 1994).

2.2. Oogenesis

Oogenesis adalah proses pembentukan, pertumbuhan dan pematangan sel kelamin betina. Lain halnya dengan spermatogenesis, oogenesis berhenti sekitar lahir, walaupun ia dapat berhenti lebih awal atau sedikit lebih lambat. Sebagai contoh, oogenesis pada sapi dan domba berhenti masing-masing 110 dan 50 hari sebelum lahir (Tomaszewska *et al.*, 1991).

Pembentukan telur diawali dengan pertumbuhan dan invaginasi daerah sempit, di epitel kecambah. Sel-sel yang terbentuk kemudian dipisahkan dari epitel kecambah, membentuk sarang telur, lalu masuk ke dalam lapisan korteks dan selanjutnya berbiak dan tumbuh. Setelah satu dari sel-sel ini berkembang menjadi bakal telur. Pada saat ini oogonia dilingkari oleh satu lapis epitel pipih yang kadang-kadang disebut sel-sel folikuler (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Sel kecambah primordial (*primordial germ cell*) adalah satu-satunya sumber dari sel telur dewasa yang menyebar secara sempurna di seluruh bagian korteks, dan selanjutnya sel kecambah primordial berubah menjadi oogonia yang memiliki morfologi yang khas. Oogonia selanjutnya mengalami pembelahan mitosis dan berubah menjadi oosit primer (Hardjopranjoto, 1995).

Hardjopranjoto (1995) menyatakan bahwa proses pembentukan oosit dapat dibedakan atas tiga tahap yaitu tahap proliferasi, tahap pertumbuhan, tahap

pematangan. Tahap proliferasi terjadi pada periode embrional sampai beberapa saat sebelum lahir. Sel telur akan membagi diri secara mitosis. Bentuk oogonia akan tetap sampai hewan betina menjelang dewasa kelamin. Tahap pertumbuhan, akan terjadi secara periodik pada hewan betina setelah mencapai pubertas dan sesudahnya, kecuali pada hewan betina yang bunting. Tahap ini ditandai dengan bertambahnya kuning telur pada sitoplasmanya, berkembangnya zona pelusida, terjadi proliferasi sel-sel folikel dan terbentuknya oosit primer. Tahap pematangan, terjadi pada fase proestrus sampai estrus dari setiap siklus birahi dimana terjadi perubahan oosit primer menjadi oosit sekunder dan sel telur dewasa. Pada tahap ini terjadi pembelahan meiosis sehingga jumlah kromosom menjadi separuhnya, disamping itu terbentuk polar bodi I dan polar bodi II. Selama tahap awal pertumbuhan oosit yang belum berkembang berada dekat permukaan ovarium hewan dewasa (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Pertumbuhan oosit terbagi atas dua fase, yaitu selama fase pertama oosit bertumbuh cepat dan erat berhubungan dengan perkembangan folikel ovarium. Ukuran dewasanya tercapai kira-kira pada waktu pertumbuhan antrum dimulai di dalam folikel. Selama fase kedua oosit tidak bertambah besar, sedangkan folikel ovarium yang merespon terhadap hormon-hormon hipofisis sangat bertambah besar diameternya (Toelihere, 1981).

Tahap terakhir dari oogenesis adalah periode transformasi atau pematangan oosit. Pada sapi dan domba, proses terjadi dalam waktu 24 jam dan terbagi dalam dua tahap yaitu tahap induksi dan tahap sintesis. Tahap induksi adalah tahap mulai terjadinya pembelahan oosit dan banyak pengaruh dari lingkungan luar oosit yang

berperan, terutama dari unsur-unsur yang terdapat folikel. Pada tahap sintesis terjadi pada 18 jam kemudian dan pada saat itu oosit mulai menyempurnakan pematangannya dengan melakukan berbagai sintesis yang dikenal dengan oogenesis (Gordon, 1994).

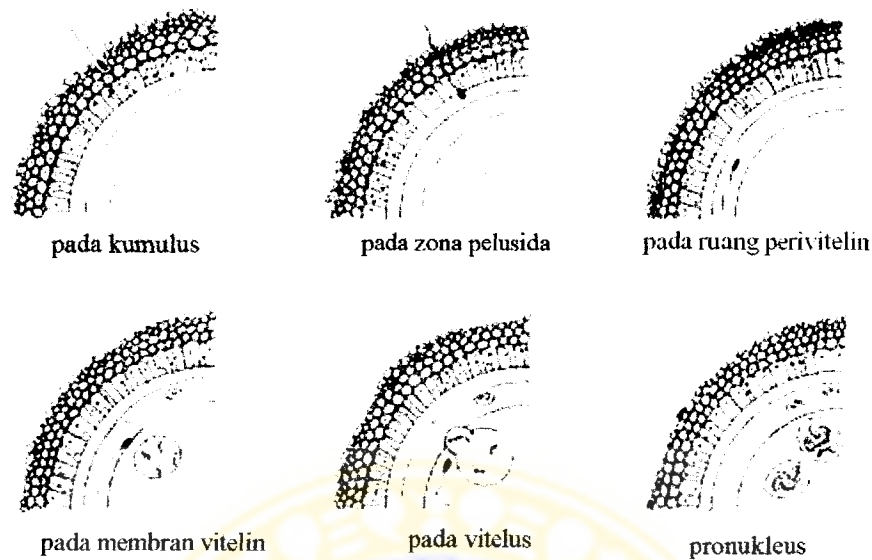
2.3. Pembuahan

Seluruh proses reproduksi seksual berpusat pada kejadian fertilisasi atau pembuahan. Fertilisasi tidak selalu suatu proses reproduksi, melainkan penyatuan atau fusi (peleburan) dua sel, gamet jantan dan gamet betina untuk membentuk suatu zigot (Toelihere, 1985). Menurut Hafez (1993), fertilisasi didefinisikan sebagai integrasi paternal dan maternal kedalam embrio atau menjadi bersatunya pronukleus jantan dan pronukleus betina sehingga menghasilkan zigot.

Agar fertilisasi dapat berjalan dengan baik, maka oosit terlebih dahulu harus mengalami perubahan struktur yang disebut dengan maturasi pertama yaitu dari profase hingga menjadi metafase II dengan proses mitosis dalam inti (Mahaputra, 2001).

Salisbury dan Van Demark (1985) menjelaskan bahwa sel spermatozoa memasuki ovum dengan menembus lapisan sel kumulus, zona pelusida dan selaput vitelin. Sel-sel kumulus dan terutama sel-sel korona radiata mengarahkan spermatozoa ke ovum pada waktu melewati lapisan-lapisan tersebut. Penembusan zona pelusida oleh spermatozoa tidak diketahui dengan pasti, tetapi diperkirakan bahwa spermatozoa mengeluarkan *lysine* yang dapat membuat celah pada zona sebagai jalan untuk dilalui spermatozoa. Setelah terjadi penembusan zona pelusida

dilanjutkan dengan penembusan selaput vitelin dan spermatozoa akan memasuki ruang perivitelin. Sesudah satu spermatozoa melewati zona pelusida, terjadi suatu perubahan yang dapat menghambat penembusan zona. Reaksi zona dan vitelin ini bertujuan untuk mengurangi kemungkinan penembusan oleh lebih dari satu spermatozoa. Selanjutnya proses ini akan merangsang reaksi kortek pada ovum yang akan mencegah penembusan selubung pembungkus ovum oleh spermatozoa yang lain (mencegah polispermia). Proses ini juga merangsang pengaktifan ovum untuk melanjutkan pembelahan meiosis kedua yang tertunda. Ovum tahap metafase II menjadi anafase II, telofase II dan akhirnya melepaskan badan kutub kedua. Sementara itu spermatozoa yang masuk berkondensasi membentuk pronukleus jantan. Ovum yang telah melepaskan badan kutub kedua, intinya membentuk pronukleus betina dengan 1 N komplemen dari kromosom. Sementara itu spermatozoa yang masuk berkondensasi membentuk pronukleus jantan. Kedua pronukleus jantan dan betina bergerak ke tengah sitoplasma, menyatu (singami) membentuk zigot (Sorensen, 1979). Gambar proses penetrasi spermatozoa selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penetrasi Spermatozoa (Sorensen, 1979).

Sel telur yang telah dibuahi disebut zigot yang segera mengalami proses pembelahan menjadi embrio. Proses pembuahan ini memerlukan waktu 12 jam pada kelinci, 18-21 jam pada domba, 20-24 jam pada sapi dan sekitar 36 jam pada manusia (Poernomo dkk., 2004).

2.4. Pembuahan *In Vitro*

Pembuahan *in vitro* adalah proses pembuahan buatan yang dilakukan manusia dengan memanfaatkan oosit maupun sel spermatozoa di luar tubuh hewan (Poernomo dkk., 2004). Baik oosit maupun spermatozoa harus mengalami pematangan (*maturation*) sebelum mampu melakukan pembuahan. Khusus pada spermatozoa, selain mengalami proses pematangan juga harus mengalami proses kapasitasasi dan reaksi akrosom yang membuatnya mampu membuahi ovum atau oosit yang sudah matang (Austin dan Short, 1990).

Fertilisasi *in vitro* telah berhasil dilakukan pada hewan percobaan terutama kelinci, tikus dan marmut. Pada mamalia lain fertilisasi *in vitro* telah pula berhasil dilakukan, seperti pada manusia, kucing, anjing, babi, domba dan sapi. Walaupun ketika dipindahkan ke betina resepien, kebuntingan yang terjadi dilaporkan hanyalah pada manusia, sapi, kelinci, tikus serta domba (Moor dan Trounson, 1997).

Proses pembuahan *in vitro* ini dilakukan dengan cara membuat tiruan kondisi lingkungan yang terjadi pada saat pembuahan *in vivo*. Kondisi tersebut meliputi kondisi fisiologis berupa hormonal, nutrisi dan kondisi lain yang mendukung seperti kandungan gonadotropin, faktor penumbuh, hormon steroid, faktor yang disekresikan oleh oosit dan molekul yang belum diketahui (Mahaputra dan Mustofa, 2002).

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* ditentukan banyak faktor. Salah satu diantaranya adalah tingkat pematangan oosit. Ukuran oosit yang sangat heterogen serta suhu transport ovarium yang terlalu rendah atau terlalu tinggi sangat mempengaruhi pematangan oosit. Hal ini berakibat pada proses maturasinya tidak bisa sempurna (Hyttel *et al.*, 1997).

Beberapa teknik dapat dilakukan dalam proses pembuahan *in vitro*, yaitu memasukkan oosit yang telah matang ke dalam media pembuahan yang telah ditempatkan dalam sel sperma terlebih dahulu atau menempatkan oosit yang telah matang terlebih dahulu pada media pembuahan baru kemudian menempatkan sel sperma. Inkubasi yang dilakukan bervariasi antara 5 jam hingga 20-24 jam setelah pembuahan (Mahaputra, 2002).

2.5. Perkembangan Embrio

Perkembangan embrio dimulai sesaat setelah terjadinya pembuahan. Hasil dari pembuahan adalah embrio satu sel yang disebut zigot. Di dalam zigot mulai ada sel-sel yang memisahkan diri dan terjadi pembagian sel yang berantai yang disebut *cleavage* (Bearden dan Fuquay, 1992; Hafez, 1993). Selanjutnya dikatakan bahwa pembagian sel ini berjalan secara mitosis, tiap-tiap sel anak memperoleh pasangan kromosom lengkap seperti sel induknya. Pembelahan dimulai dari dalam inti dan diteruskan ke sitoplasma. Mula-mula terbentuk 2 sel yang mirip satu dengan yang lainnya, selanjutnya 2 sel tadi segera membelah lagi menjadi 4 sel. Kemudian pembelahan berlanjut, tetapi tidak serempak dan tidak sama bentuk atau besarnya, dengan demikian dapat terbentuk sel-sel yang besarnya bermacam-macam (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Selanjutnya dikatakan bahwa, pada perkembangan awal dari sel telur, bahan makanan persediaan di simpan di dalam sitoplasma dalam bentuk kuning telur (deutoplasma). Proses pembelahan ini berjalan cepat sehingga sebelum sel tersebut berkesempatan tumbuh, sudah membelah lagi sehingga sel-sel anak makin banyak jumlahnya tetapi makin lama makin kecil ukurannya (Hafez, 1993).

Stadium morula ditandai dengan massa sel keluar dan sel dalam yang terdiri dari 16-32 sel. Pada stadium morula sel-sel anaknya disebut blastomer. Besar sebuah morula tidak berbeda jauh dengan besarnya zigot. Tahap perkembangan embrio normal pada sapi mulai 1 sel sampai blastosis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tahap perkembangan embrio normal pada sapi

Tahap perkembangan embrional	Hari setelah ovulasi
1 sel	0 – 1
2 sel	0 – 2
4 sel	1 – 2
8 sel	2 – 4
awal morula	3 – 5
morula kompak	4 – 6
awal blastosis	6 – 7
blastosis	6 – 8
blastosis lanjut	7 – 9
blastosis tetas	8 – 10

Sumber : Betteridge (1977) yang dikutip oleh Hafez (1993).

Suatu ketika sel-sel embrio saling memisahkan diri membentuk bola yang mengelilingi ruangan (*blastocoel*) di tengah-tengah embrio (Anonimus, 2002). Pada saat *blastocoel* telah terbentuk maka pertumbuhan embrio seolah-olah terbagi dua, karena ada bagian sel yang tumbuh membentuk sel-sel tipis di permukaan yang hampir menyelubungi hampir seluruh bagian *blastocoel*. Bagian yang menyelubungi disebut *throphoblast*, sedangkan bagian yang diselubungi disebut *inner cell mass* (Partodiharjo, 1992).

Sel *throphoblast* mempunyai fungsi untuk transportasi cairan selama pembentukan blastosis dan untuk merusak sel endometrium dalam rangka untuk implantasi. *Inner cell mass* terjadi peningkatan pemberian makanan dari kantong kuning telur dan jaringan ekstra embrionik lain (Margawati, 1996). Ketika terbentuk ruang di antara sel-sel embrio disebut blastosis. Stadium ini ditandai

dengan jumlah selnya lebih banyak dari 32 sel, lalu akan tampak perbedaan morfologi sel yang tidak *uniform*, terutama pada akhir blastosis (blastosis tetas) (Mahaputra, 2001).

2.6. Media Perkembangan Oosit dan Embrio

Dalam proses pematangan oosit dan perkembangan oosit secara *in vitro*, diperlukan media yang dapat berfungsi sebagai tempat penyediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit. Nutrisi yang terdapat dalam media merupakan zat-zat yang terlarut seperti glukosa, asam amino, ion anorganik yang diperlukan untuk metabolisme dan diferensiasi sel oosit maupun embrio (Soenardiharjo, 1990 yang dikutip oleh Rodiah, 1996).

Komposisi media *in vitro* harus dibuat mirip dengan kondisi aslinya, yaitu tempat dimana sel telur berkembang secara alamiah. Untuk mencapai kondisi media yang baik diperlukan beberapa syarat, antara lain kemurnian media, tekanan gas yang sesuai, suhu dan kelembaban inkubator yang optimum (Dasrul, 1997). Pada kondisi *in vitro* tetap tidak sebaik kondisi *in vivo*, oleh karena itu perlu penambahan berbagai substansi pada media *in vitro* untuk mencapai tingkat kematangan yang sama dibanding pada media *in vivo* (Soenardihardjo, 1990 seperti yang dikutip Margawati, 1996).

Media pembiakan yang digunakan untuk pematangan oosit *in vitro* dapat berupa media alami yang berasal dari hewan sendiri seperti serum darah, cairan folikel dan lain-lain atau berupa media buatan seperti media biakan jaringan (TCM-199). Media pembiakan yang dipakai untuk pematangan oosit sapi, tidak

hanya bisa mempengaruhi perkembangan oosit yang mencapai metafase II dan mampu melakukan pematangan, tetapi juga mempengaruhi perkembangan embrio selanjutnya (Bavister *et al.*, 1992).

Media pembiakan oosit umumnya berisi *Bovine Serum Albumin* (BSA) atau serum darah yang telah diinaktivasi 56 °C selama 30 menit. Proses inaktivasi bertujuan untuk menghancurkan suatu faktor perusak sel telur yang termolabil (Toelihere, 1981; Hafez, 1993).

Untuk menjaga agar pH media tetap berkisar antara 7,2-7,4 perlu lingkungan atmosfer 5% CO₂ dalam udara, atau lebih baik 5% CO₂, 5% O₂ dan 90% N₂ (Jaenudeen *et al.*, 2000). Untuk penyimpanan pada lingkungan udara (tanpa CO₂) ditambahkan Hepes dalam media, dimaksudkan sebagai buffer, sedangkan penambahan NaCl bertujuan untuk menjaga osmolaritas media agar tetap (Soenardiraharjo, 1990 yang dikutip Margawati, 1996). Osmolaritas yang sering digunakan antara 270-300 mOsm/Kg (Jaenudeen *et al.*, 2000).

Media biakan yang digunakan untuk pematangan oosit dapat digolongkan ke dalam media sederhana dan media kompleks. Media sederhana adalah media kultur dengan komposisi dasar yaitu : garam, bicarbonat, energi substrat (piruvat, laktat, glukosa) dan protein. Perbedaan pokok antara berbagai jenis media sederhana terletak pada perbedaan konsentrasi ionnya dan konsentrasi sumber energinya. Media kompleks merupakan media sederhana yang telah ditambahkan asam amino dan vitamin di dalamnya (Siedel dan Moore, 1991).

2.7. *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG)*

Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) adalah hormon yang terdapat dalam serum bangsa *equidae* (kuda, kuldi zebra) yang sedang bunting, Cole dan Hart menemukan hormon ini untuk yang pertama kalinya pada tahun 1930. Hormon ini mulai disintesis oleh sel-sel trofoblast (*chorionic gridle*) yang akhirnya membentuk *endometrial cups*, setelah umur kebuntingan kuda mencapai 35 hari (Stabenfeldt dan Edqvist, 1993). Penelitian lebih lanjut dengan mempergunakan uji biologi yang lebih baik, diketahui bahwa PMSG mulai muncul dalam darah pada hari ke-40 dan kadarnya meningkat terus sampai mencapai lebih dari 260 RU (rat-unit) permililiter darah kuda (Partodihardjo, 1992).

Menurut Hunter (1995), PMSG mencapai titer tertinggi dalam darah kurang lebih antara hari ke-60 sampai hari 90 dari masa kebuntingan. Menurut Davidson *et al.*, (1997) yang dikutip oleh Trisnaati (2004) puncak konsentrasi PMSG dalam darah terdapat pada umur kebuntingan antara 110-130 hari. Pada hari ke-65, menurut Partodihardjo (1992) kadar PMSG mulai menurun perlahan-lahan hingga kira-kira pada hari yang ke-170 mencapai titik dimana secara uji biologi sudah tidak dapat lagi diketahui adanya, tetapi masih dapat diketahui secara RIA (*Radio Immunoassay*). Serum kuda bunting disamping mengandung PMSG (Hunter, 1995) juga mengandung progesteron dan estradiol 17β (Mahaputra, 1997).

Pregnant Mare's Serum Gonadotropin merupakan hormon gonadotropin kelompok glikoprotein yang tergolong bermassa molekul besar berkisar antara 60.000 Dalton (Ismudiono, 1999). Gonadotropin ini sumbernya bukan berasal

dari kelenjar hipofisa. *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* terdiri dari 2 ikatan kovalen sub unit α dan sub unit β . Sub unit α nya tersusun dari 96 asam amino (Knobil dan Neill, 1994), sementara sub unit β nya tersusun dari 149 asam amino (Murphy dan Martinuk, 1991). Perbedaan kandungan asam amino di antara kedua sub unit tersebut menyebabkan massa molekul sub unit β lebih besar daripada sub unit α . Hormon ini mengandung protein 30 sampai 40%, 41-45% hidrat arang serta memiliki kadar asam sialat yang tinggi (10,8%). Tingginya kadar asam sialat ini mencegah proses degradasi PMSG di dalam hati dan memperlama waktu paruh PMSG di dalam darah (Bindon dan Piper, 1981).

Secara biologik PMSG mempunyai fungsi dan daya kerja serupa dengan campuran FSH dan LH dari kelenjar hipofisa anterior tetapi pengaruh utamanya lebih menyerupai FSH (Hardjopranjoto, 1984).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah kuda bunting dilakukan di peternakan kuda di daerah Kenjeran Surabaya. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kebidanan Bagian Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Mei 2004 sampai dengan Juli 2004.

3. 2. Materi Penelitian

2.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan untuk penelitian ini adalah serum kuda bunting dengan umur kebuntingan 2,5 bulan dan 3,5 bulan. Methanol digunakan sebagai bahan ekstraksi.

Ovarium sapi yang mengandung oosit, media pencuci oosit : *Oocyte Washing Solution* (OWS), media maturasi : TCM-199, media kapasitasasi dan media fertilisasi : *Earle's Balance Salt Solution* (EBSS), semen beku sapi, aquades, kertas *tissue* dan minyak parafin.

3.2.2. Alat-alat Penelitian

Tabung steril, alat pengocok (*Vortex*), *blowing pump* (Gast) dan *waterbath* (Memmert) untuk ekstraksi serum. Lemari es, *incubator CO₂* (Compact CO₂ series 5000, Thermolyne, USA) dilengkapi pengatur suhu dan kelembaban,

mikroskop stereo disekting (Meiji) untuk koleksi dan pengamatan oosit, mikroskop *inverted* (Meiji) untuk pengamatan embrio, bilik steril (laminar Air Flow, Speg Air Tech, Prc.) dengan sinar ultra violet, pipet mikro (Eppendorf varipipette) beserta ujung pipet (pipet tip), pipet Pasteur, timbangan mikro (Chio electronic balance), sentrifuse (Hettich EBA 3S), *freezer*, thermometer, gelas Erlenmeyer, gelas beker, cawan petri kaca diameter 35 mm dan 90 mm, millifor 0,22 μm (Sartorius-Minisart, NML).

Alat-alat tambahan lainnya : syringe (sprit) 5 ml, 10 ml, 60 ml, jarum suntik 18 G, cawan petri *disposable* (Nuclon, Denmark), sterilisator (Aesculap-Werketuttlingen, Germany), pH meter (Microcomputer pH meter Lec 60).

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pengambilan Serum Darah

Darah diambil dari kuda bunting umur 2,5 dan 3,5 bulan, melalui vena jugularis dengan menggunakan syringe (sprit) 50 ml kemudian ditampung dalam tabung kaca steril dan ditutup rapat. Darah yang telah ditampung didiamkan beberapa saat sampai menggumpal, kemudian dilakukan penusukan pada permukaan gumpalan darah hingga terlepas dari dinding tabung dan didiamkan kembali selama 3 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga serum dengan mudah dapat diambil. Serum yang didapatkan disaring dengan millifor 0,22 μm dan disimpan dalam lemari es (Mahaputra, 1995).

3.2.2. Pembuatan Ekstrak Serum Kuda Bunting

Serum darah kuda bunting umur 2,5 dan 3,5 bulan masing-masing diambil sebanyak 1ml dan ditempatkan dalam 2 tabung gelas. Setiap tabung gelas ditambahkan 5 ml methanol dan dikocok selama 3 menit kemudian didiamkan 15-20 menit sampai terdapat dua lapisan cairan. Supernatan diambil dengan pipet dan dimasukkan ke tabung ekstraksi untuk diuapkan dalam *waterbath* pada suhu 39 °C dan ditiup dengan bantuan *blowing pump* sampai cairan menguap seluruhnya (Trisnaati, 2004). Proses pembuatan ekstrak dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pembuatan Ekstrak

3.3.3. Koleksi Oosit

Pengambilan ovarium sapi dilakukan di Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya. Ovarium dimasukkan dalam kantong plastik berisi cairan fisiologis dan dimasukkan dalam termos dengan suhu 37 °C untuk kemudian dibawa ke Laboratorium. Ovarium dibersihkan dari jaringan pengikatnya dan dicuci dengan garam fisiologis. Dengan menggunakan spuit 10 ml dan jarum 18G tiap folikel

dengan diameter 2-5 mm diaspirasi melalui jaringan ovarium yang ditunjukkan pada Gambar 3. (Mahaputra, 1997).



Gambar 3. Aspirasi Oosit dari Ovarium

Oosit hasil aspirasi ditampung dalam tabung kaca yang diletakkan dalam *waterbath* dengan suhu 37 °C. Oosit diseleksi di bawah mikroskop stereo disekting dengan pembesaran 40x. Hasil koleksi dicuci dengan OWS dua kali dan kemudian dicuci dengan media pematangan TCM-199, seperti yang terlihat pada Gambar 4. (Mahaputra, 1997).



Gambar 4. Koleksi Oosit dengan Mikroskop Stereo Disekting

3.3.4. Maturasi Oosit

Maturasi atau pematangan oosit dilakukan pada cawan petri *disposable* dengan media pematangan TCM-199 yang ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) 10%, Na piruvat 100 μ l, gentamisin 250 μ g. Masing-masing sebanyak 10 oosit dimasukkan ke dalam media TC-199 yang mengandung 10% serum kuda dengan umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan sebagai media pematangan. Penambahan ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan sebagai perlakuan 1 (a_0b_0), *non* ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan sebagai perlakuan 2 (a_0b_1), ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan sebagai perlakuan 3 (a_1b_0), *non* ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan sebagai perlakuan 4 (a_1b_1). Masing-masing perlakuan dibuat dalam tetes pada cawan petri (1 tetes = 50 μ l), kemudian ditutup dengan minyak mineral untuk mencegah penguapan media pematangan, mencegah kontaminasi, menjaga kelembaban maksimal, menjaga pH dan osmolalitas media dan mengurangi fluktuasi suhu yang ekstrim. Kemudian cawan petri yang telah berisi oosit dimasukkan dalam inkubator dengan fase gas CO₂ 5 % dalam udara, suhu 38,5 °C dan kelembaban 95 % selama 24 jam (Mahaputra, 1997)..

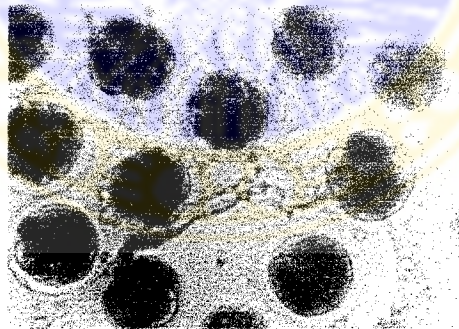
3.3.5. Kapasitas Spermatozoa

Semen beku sapi dikeluarkan dari container N₂ cair dan *dithawing* dengan cara dibiarkan pada suhu kamar selama \pm 5 detik dan kemudian direndam dalam air hangat bersuhu 37 °C. Selama 1 menit ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 1 ml larutan pencuci semen EBSS dan kemudian ditambahkan semen yang telah *dithawing*. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm sebanyak dua kali. Supernatan dibuang dengan pipet Pasteur steril, endapan

diperiksa di bawah mikroskop untuk mengetahui keadaan spermatozoa. Spermatozoa dipisahkan dan dicuci dengan teknik *swim-up* selama 30 menit pada media EBSS (Mahaputra, 1997).

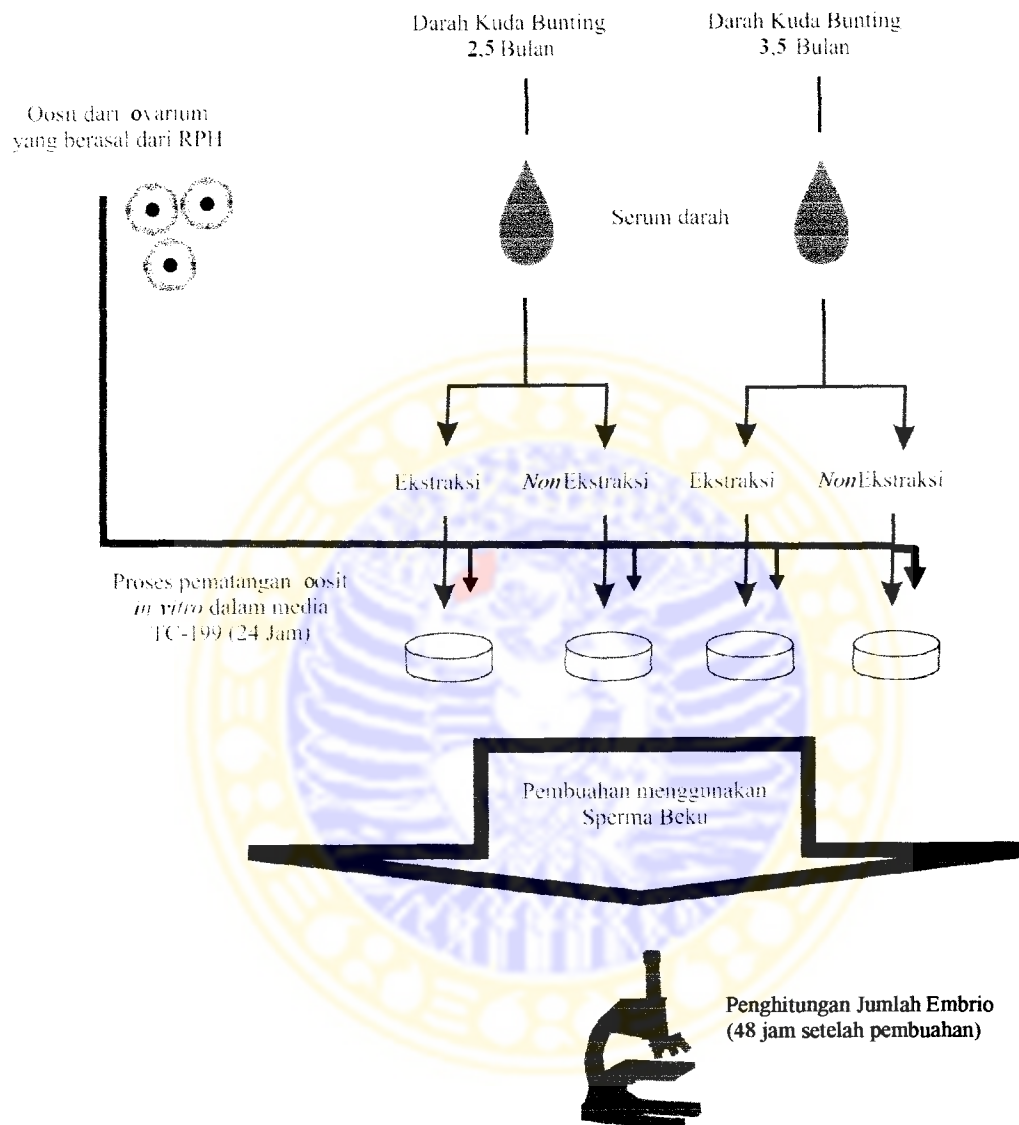
3.3.6. Pembuahan *In Vitro*

Media pembuahan EBSS diteteskan pada cawan petri dengan bentuk *rosset*, yaitu tetes besar di tengah berisi 100 μl dikelilingi delapan tetes kecil berisi masing-masing 25 μl , kemudian tetes kecil dihubungkan dengan tetes besar dan ditutup dengan minyak mineral dan dimasukkan dalam inkubator CO_2 bersuhu 38,5 °C selama 1 jam. Oosit yang telah matang diteteskan pada tetes kecil media dan ditambahkan 10 μl spermatozoa hasil *swim-up* pada tetesan tengah dan selanjutnya dimasukkan kembali pada inkubator CO_2 bersuhu 38,5 °C selama 48 jam untuk kemudian dilakukan pengamatan keberhasilan pembuahan terhadap masing-masing perlakuan dengan mikroskop. Embrio hasil pembuahan *in vitro* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Embrio Hasil Pembuahan *In Vitro*

Skema metode penelitian secara rinci dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema Metode Penelitian

3.3.7. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan faktorial. Empat faktor perlakuan media pematangan TCM-199 yang ditambahkan ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan (a_0b_0), *non* ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan (a_0b_1), ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan (a_1b_0) dan *non* ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan (a_1b_1). Diamati tingkat keberhasilan pembuahan dengan menghitung persentase jumlah embrio yang ditemukan 48 jam setelah pembuahan.

3.3.8. Analisis Data

Data yang disajikan berupa rata-rata jumlah embrio yang ditemukan setelah pembuahan *in vitro* diolah dengan menggunakan sidik ragam dan selanjutnya apabila terjadi perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji perbandingan berganda dengan uji BNT (Beda Nyata Kecil) 5% (Steel dan Torrie, 1993).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Dari penelitian yang telah dilakukan yaitu tentang pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro* dengan menghitung persentase jumlah embrio hasil pembuahan pada tiap kelompok pematangan oosit yang telah ditambahkan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting 2,5 dan 3,5 bulan ke dalam masing-masing kelompok media pematangan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan *In Vitro* Setelah Ditransformasi Arcsin \sqrt{y}

Perlakuan	Ulangan	Rata-rata	Std. Deviasi
3 (a ₁ b ₀)	9	6,76 ^a	1,16
4 (a ₁ b ₁)	9	6,41 ^{ab}	0,99
1 (a ₀ b ₀)	9	6,06 ^{bc}	0,74
2 (a ₀ b ₁)	9	5,69 ^c	0,80

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Dari Tabel 2. di atas dengan memperhatikan Lampiran 4. diperoleh hasil $F_{hitung} = 0,001 < F_{tabel(1,32)} = 4,15$ dengan taraf signifikan 5% pada interaksi ab artinya dari perhitungan rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antara perlakuan umur serum kuda bunting dan perlakuan ekstrak dan *non* ekstrak terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro*. Untuk faktor a dengan melihat Lampiran 4. didapatkan hasil

$F_{hitung} = 5,16 > F_{tabel(1,32)} = 4,15$ dengan taraf signifikan 5% artinya terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan umur serum kuda bunting 2,5 dan 3,5 bulan terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro*. Pada faktor b hasil $F_{hitung} = 1,37 < F_{tabel(1,32)} = 4,15$ dengan taraf signifikan 5% menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada perlakuan ekstrak dan *non* ekstrak terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro*. Pada Lampiran 5. terlihat hasil tertinggi didapatkan dari perlakuan 3 (a_1b_0) yaitu serum kuda umur kebuntingan 3,5 bulan yang dilakukan ekstraksi, diikuti oleh perlakuan 4 (a_1b_1) yaitu serum kuda bunting 3,5 bulan yang tidak dilakukan ekstraksi, perlakuan 1 (a_0b_0) yaitu kelompok yang ditambahkan serum kuda bunting 2,5 bulan yang diekstraksi dan hasil terendah didapatkan pada perlakuan 2 (a_0b_1) yaitu kelompok yang mendapat *aditive* serum kuda bunting 2,5 bulan tanpa ekstraksi.

BAB V

PEMBAHASAN

Pregnant Mare's Serum Gonadotropin disebut sebagai *hormon non puititary gonadotropin*. Gonadotropin ini sumbernya bukan berasal dari kelenjar hipofisa. Pada permulaan bulan kedua masa kebuntingan kuda, dibentuk oleh mangkok-mangkok endometrium di kornua uteri bunting yang memproduksi hormon PMSG atau eCG (Arthur dkk, 1989). *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* merupakan hormon gonadotropin kelompok glikoprotein yang tergolong bermassa molekul besar berkisar antara 60.000 Dalton (Ismudiono, 1999). *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) terdiri dari 2 *nonkovalen* subunit α dan subunit β .

Ekstraksi yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan kandungan senyawa hormon PMSG tersebut dalam konsentrasi yang murni untuk dilarutkan kembali menggunakan pelarut media pematangan TCM-199.

Rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* setelah penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media maturasi oosit dapat terlihat pada Tabel 2, diperoleh bahwa rata-rata jumlah embrio dari keempat perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, secara berturut-turut adalah $6,76 \pm 1,16$; $6,41 \pm 0,99$; $6,06 \pm 0,74$; $5,69 \pm 0,80$, tetapi faktor α yaitu perlakuan umur serum kuda bunting memberi pengaruh yang nyata terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro* ($p > 0,05$).

Dapat diamati adanya peningkatan rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* pada setiap perlakuan, hasil tertinggi di dapat dari perlakuan a_1b_0 . Hal ini disebabkan pada umur kebuntingan 3,5 bulan mengandung paling banyak

gonadotropin (PMSG) dan berupa ekstrak yang mana kandungannya lebih murni dibanding yang *non* ekstrak.

Pada perlakuan a_1b_1 menunjukkan jumlah embrio lebih rendah dari perlakuan a_1b_0 , hal ini dapat disebabkan kandungan hormon PMSG umur kebuntingan 3,5 bulan yang ditambahkan dalam media pematangan masih tercampur dengan hormon steroid lain.

Hasil perlakuan a_0b_0 memberikan jumlah lebih rendah dari perlakuan a_1b_1 , hal ini dikarenakan kandungan PMSG umur kebuntingan 2,5 bulan ini lebih sedikit dibandingkan umur kebuntingan 3,5 bulan sehingga kemampuannya untuk menginduksi pematangan oosit kurang memadai.

Untuk perlakuan a_0b_1 menunjukkan jumlah embrio yang paling rendah, hal ini disebabkan kandungan hormon PMSG dari umur kebuntingan 2,5 bulan belum mencukupi untuk menginduksi pematangan oosit dan tanpa pengekstraksian serum masih tercampur dengan hormon lain antara lain progesteron dan estrogen.

Li *et al.* (2004) mengemukakan terdapat indikasi adanya hambatan pematangan inti dan sitoplasma dan kompleks kumulus-oosit babi. Ketika kompleks kumulus-oosit dikultur dalam media yang mengandung progesteron sendiri atau bersama dengan estrogen, tidak terdapat perbedaan yang nyata pada pematangan inti, ekspansi sel kumulus atau perubahan *in vitro* terhadap kontrol.

Penambahan serum kuda bunting pada media pematangan oosit *in vitro* ternyata mampu meningkatkan persentase oosit yang matang, baik dengan kadar serum kuda bunting 5% apalagi 10% (Supriatna, 1993 dalam Restiadi, 1999), dimana di dalam serum kuda bunting tersebut terkandung hormon PMSG yang

lebih bersifat FSH disamping sedikit LH (Toelihere, 1981). Maturasi oosit sempurna terjadi saat gertakan hormon LH memuncak selama praovulasi, ditandai dengan terjadinya pelepasan polar bodi I dan tercapainya tahap metafase II dan pembelahan meiosis inti (Hafez, 1993). *Luteinizing Hormone* dapat merubah distribusi kalsium dalam ooplasma, meningkatkan oksidasi glukosa dalam mitokondria pada sekeliling sel kumulus oosit sapi. *Luteinizing Hormone* juga meningkatkan metabolisme glutamin dalam oosit. Beberapa peneliti menyatakan bahwa FSH mempunyai efek menguntungkan bagi perkembangan oosit. Menurut Mahaputra dkk (1990), secara seluler FSH bekerja mempengaruhi pertumbuhan, proliferasi dan peningkatan fungsi sel-sel granulosa pada antral folikuler. Sel granulosa akan mengalami luteinisasi bila ada gertakan *Luteotropic Hormone* (LTH), sedang sel kumulus hanya memberi reaksi pembentukan mucin. Pada tikus, jumlah reseptor spesifik terhadap LH dan hCG di setiap lapisan sel granulosa berbeda. Jumlah reseptor akan menurun dari lapisan yang terletak pinggir kelapisan tengah (antral). Sel kumulus di sekitar oosit, hampir tidak menunjukkan daya ikat terhadap hormon LH. Lapisan bagian dalam sel kumulus oophorus secara morfologis berhubungan erat dengan oosit. Hubungan antara oosit dan sel kumulus oophorus dihubungkan oleh suatu rongga penghubung yang disebut *gap junction*. Rongga penghubung ini akan pecah bila ada rangsangan hormon gonadotropin dari hipofisa (Austin dan Short, 1990). Setiap tingkatan kematangan oosit mempunyai korelasi dengan tipe dari sel kumulus. Ikatan antar sel kumulus akan meregang menjelang waktu ovulasi disertai dengan produksi substansi gelatin yang akan berperan mengikat sel-sel kumulus yang meregang.

Fungsi perkembangan (ekspansi) sel kumulus, selain mendorong pematangan oosit juga untuk meningkatkan sekresi progesteron. Beberapa peneliti yang dikutip Younis dkk, (1991) melaporkan bahwa 90-100% kultur oosit mencapai tahap metafase II dengan adanya hormon gonadotropin dalam serum.

Adanya gonadotropin pada media akan menambah perluasan sel kumulus yang mengelilingi oosit dalam urutan peningkatan kapasitas dan proses fertilisasi. Meskipun pengukuran status meiotik, fertilisasi dan kecepatan *cleavage* (pembelahan) tidak sebanding dari maturasi fisiologi. Adanya sel kumulus yang kompak di sekeliling oosit dan penampilan ooplasma yang homogen merupakan indikator dari kemampuan oosit yang belum matang untuk mengalami pematangan dan perkembangan embrio (Rodiah, 1996). Bila proses maturasi tidak serempak maka kemungkinan ada oosit yang *over matured* yang ditandai dengan *cumulus oophorus expansion*. Oosit yang *over matured* sulit ditembus spermatozoa karena adanya *cumulus oophorus expansion* dan selanjutnya akan mengalami degenerasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Aurich dan Han (1994) bahwa tingkat fertilisasi lebih baik pada oosit sudah masak meskipun sel kumulus yang tebal ini merupakan hambatan bagi spermatozoa untuk melakukan penembusan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Penambahan ekstrak serum kuda bunting secara numerik meningkatkan jumlah embrio hasil fertilisasi *in vitro* dibandingkan serum kuda bunting *non* ekstraksi walaupun tidak signifikan.
2. Tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap angka pembuahan oosit pada masing-masing perlakuan, akan tetapi terdapat pengaruh yang nyata pada faktor a yaitu perlakuan umur serum kuda bunting terhadap hasil pembuahan *in vitro*. Secara numerik, perlakuan dengan penambahan ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan memberikan pengaruh yang paling baik.

6.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis konsentrasi PMSG di dalam serum kuda bunting yang diekstraksi dan *non* ekstraksi dengan menggunakan uji Elisa.

RINGKASAN

Vikhadena Maharani. “Pengaruh Penambahan Ekstrak dan *Non* Ekstrak Serum Kuda Bunting pada Media Pematangan Terhadap Pembuahan *In Vitro* pada Sapi “. Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan Bapak Prof. Dr. Loba. Mahaputra, M. Sc., drh sebagai pembimbing pertama dan Bapak Mufasirin, M. Si., drh sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan terhadap pembuahan oosit *in vitro* dan untuk mengetahui adanya perbedaan penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda, umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan pada angka pembuahan oosit *in vitro* pada sapi.

Serum darah kuda bunting didapatkan dengan mengambil darah kuda pada umur kebuntingan 2,5 dan 3,5 bulan melalui vena jugularis. Serum kuda bunting yang diambil diekstraksi menggunakan methanol dan dilakukan pengeringan (*blowing up*). Oosit didapatkan dengan aspirasi ovarium yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Pada perlakuan 1 (a_0b_0) oosit dimatangkan dalam media pematangan TCM-199 yang ditambahkan ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan, perlakuan 2 (a_0b_1) oosit dimatangkan dalam media pematangan TCM-199 yang ditambahkan *non* ekstrak serum kuda bunting 2,5 bulan, perlakuan 3 (a_1b_0) oosit dimatangkan dalam media pematangan TCM-199 yang ditambahkan ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan, perlakuan 4 (a_1b_1) oosit dimatangkan dalam media pematangan TCM-199 yang ditambahkan *non* ekstrak serum kuda bunting 3,5 bulan. Setelah inkubasi selama 24 jam oosit matang siap

dilakukan pembuahan dan pengamatan embrio dilakukan 48 jam setelah pembuahan.

Parameter yang diamati adalah rata-rata jumlah embrio pada setiap perlakuan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Faktorial dan data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam, apabila ada perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT 5%.

Hasil penelitian tidak menunjukkan adanya pengaruh perbedaan peningkatan rata-rata jumlah embrio setelah penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan oosit secara berturut-turut pada perlakuan 3 (a_1b_0), perlakuan 4 (a_1b_1), perlakuan 1 (a_0b_0), perlakuan 2 (a_0b_1). Rata-rata persentase jumlah embrio dari keempat perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, secara berturut-turut adalah $6,76 \pm 1,16$; $6,41 \pm 0,99$; $6,06 \pm 0,74$; $5,69 \pm 0,80$, tetapi faktor a yaitu perlakuan umur serum kuda bunting memberi pengaruh yang nyata terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro*. Bertitik tolak dari hasil tersebut disimpulkan bahwa pengaruh penambahan ekstrak dan *non* ekstrak serum kuda bunting pada media pematangan oosit tidak memberikan pengaruh peningkatan rata-rata jumlah embrio hasil pembuahan *in vitro* dan secara numerik hasil tertinggi ditunjukkan pada perlakuan a_1b_0 .

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1986. Sediaan Galenik. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta.19
- , 1993. Standard of Asean Herbal Medicine I. Asean Countries. Jakarta. 486-487
- , 1995_a. Farmakope Indonesia. 7
- , 1995_b. Penelitian Tanaman Obat di Indonesia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi. Jakarta. 10
- , 2002. Embryo Development in Animals.
http://www.kecin-edu/~biology/embr_lab.html#development.
- Arthur, G.H., D.E. Noakes and H. Pearson. 1989. Veterinary Reproduction and Obstetric (theriogenology) 6thEd. BailliereTindall. 62-63; 68-69.
- Aurich, C. and J.Han. 1994. In Vitro Maturation Fertilisation and Culture of Bovine Oocytes in a Modifed Menzo B₂ Medium. J. An. Reprod. Sci : 35,153-162.
- Austin.C.H and R.V. Short. 1990. Oogenesis and Ovulation, The Egg, Spermatogenesis and Fertilization in Germ Cell and Fertilization Reproduction In : Mamonals I. Editor : Austinand Short 2nd Edition. Cambrige University Press. Cambrige. England. 46-164.
- Bearden, H. J and J. W. Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction. Third Ed. Pretice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey. 78-93
- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of In Vitro Fertilized Bovine Embryo Into Morulae and Blastocyst in Defined Culture Media. J. Theriog. 37: 134-139.
- Bindon, B.M., and L.R. Piper. 1981. Physiological Basis of The Ovarian Response to PMSG in Sheerp and Cattle. In Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats. Australia Society for Reproductive Biology : 1-4.
- Dasrul, 1997. Pengaruh Penambahan Serum Hewan Birahi pada Media Biakan Terhadap Pematangan Oosit dan Pembuahan *In Vitro* pada Kambing Lokal. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. 30 : 1-2.

- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos Development of Animal Science and Production*. Cambridge. UK. 640.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Feb. Ger. 6th Edition Philadelphia. USA. 144-188.
- Hardjoprano, S. 1984. *Fisiologi Reproduksi*. Edisi Kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya . 49-55, 100-190.
- , S. 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. 19-53.
- Hunter, R.H.F., 1995. *Fisiologi dan Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung. Penerbit Universitas Udayana. 74-76.
- Hyttel, P., Fair, H. Callesen, T. Greve. 1997. *Oocyte Growth Capacitation and Final Maturation in Cattle*. *J. Theriogenology*. 47 :23-32.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 30-80.
- Jainudeen, M.R., H. Wahid, E.S.E. Hafez. 2000. *Ovulation Introduction, Embryo Production and Transfer*. In : E.S.E. Hafez (ed). *Reproduction In Farm Animal 7thEdi*. Lea and Febiger. Pennsylvania. 405-430.
- Keefer, C. I., R. Koppang, P. Goluera, S. Soice, M. Maki-Laurila and Mathews. 1993. *Bovine Inner Cell Mass (ICM) Cells Donor Nuclei in the Production of Nuclear Transfer Embryos*. *J. Theriogenology*. 39 : 242.
- Knobil, E. And J. D. Neill. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Volume 2B. New York : Raven Press. M2122-2125.
- Li. Q, K. Niwa, M. G. Hunter. 2004. *Effect of 17 Beta-Estradiol on In Vitro Maturation of Pig Oocyte in Protein Free Medium*.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Display&opt=pubmed_pubmed&from_uid=15226595.
- Mahaputra, L. 1997. *Analisis Progesteron dan Estradiol 17 β Dalam Serum dan Feses Untuk Diagnosis Kebuntingan Pada Kuda*. *Jurnal Pasca Sarjana Universitas Airlangga* 6(2).111-115.
- , 2001. *Ilmu Kebidanan Veteriner*. Ed II. Cetakan Kedua. Laboratorium Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 17, 42.

- , 2002. Embrio Tranfer dan Prospeknya di Masa Depan. Seminar Biologi Nasional. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya. 3-4.
- Mahaputra, L., Mustofa, I. dan H. A. Hermadi. 1990. Pemantauan Reseptor Luteinizing Hormon Pada Ovarium Mencit Dengan Penyuntikan Luteinizing Hormon Berlabel Iodium Radioaktif (^{131}I -LH). Media Kedokteran Hewan. Vol.6 no.1. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 1-9.
- Mahaputra, L., Hinting, A., Hermadi, H. A., Mustofa, I., Utama, S., Pudjisrianto. 1995. Teknik Pembuatan Embrio Beku, kembar Identik dan Viabilitasnya Dalam Upaya Merintis Pengembangan Bank Embrio Sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/1. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. 11-15.
- Mahaputra, L., Hinting, A., Utama, S., Hermadi, H. A., Mustofa, I. 1997. Teknik Pembuatan Embrio Beku, kembar Identik dan Viabilitasnya Dalam Upaya Merintis Pengembangan Bank Embrio Sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. 11-15.
- Mahaputra, L., dan I. Mustofa. 2002. Kinerja Serum Sapi Birahi dan Kuda Birahi Sebagai Suplemen Media Maturasi Oosit Pada Fertilisasi *In Vitro* Sapi Madura. Jurnal Biosains Pasca Sarjana Vol.4 no.3. September. 113-117.
- Margawati, E.T. 1996. The Effect of Leukimia Inhibiting Factor (LIF) on Bovine Embryo Development *In Vitro*. Annales Bogorienses. 4 : 19-25.
- Moor, R. M. and A. O. Trounson. 1997. Hormonal and Follicular Factors Affecting Maturation of Sheep Oocyte *In Vitro* and Their Subsequent Developmental Capacity. J. Reprod. And Fert. 49 : 101-109.
- Murphy, B.D., and Martinuk S.D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocr Rev.* 12 : 27-44 ABS.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan Ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. 114-188; 216-223.
- Restiadi, T. I. 1999. Suplementasi Serum Kuda Bunting pada Media Maturasi dan Fertilisasi *In Vitro* Oosit Kambing Lokal. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. 1: 3-4.
- Rodiah. 1996. Pengaruh Penambahan Serum, Kombinasi FSH, LH, Estrogen dan Lama Inkubasi Terhadap Pematangan Oosit Sapi Madura. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. 2: 27-29; 33-34.

- Poernomo, B., Widjiati, M. Mafruchati, E.M. Luqman, E.D. Masithoh, A.T. Mukti. 2004. *Penuntun Embriologi*. Penerbit Pustaka Melati. Surabaya. 68-70; 77-80.
- Salisbury, G.W dan N.L. Van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi*. Terjemahan R. Djanuar. Gajah Mada University Press. 94-102 ; 114-115 ; 142-145.
- Siedel, G.E and S. Moore. 1991. *Training Manual for Embryo Tranfer in Cattle*. <http://www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117E00.htm#TOC>.
- Sorensen, M.A. 1979. *Animal Reproduction Principels and Practices*. Mc Graw-Hill Book Company. 341.
- Stabenfeldt, G.H and Edqvist, L.E. 1993. *Female Reproductive Processes*. In Swenson, M.J., Reece, W.O., eds. *Dukes. Physiology of Domestic Animal 11th Ed*. Ithaco : Comstock Publ Ass. 67-68.
- Steel, R. G. D and Torrie, J. H. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Edisi Kedua. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 210.
- Toelihere, R.M. 1981. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung. 199-228.
- , 1985. *Sel Telur Mamalia Dalam Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Edisi Keenam. Penerbit Angkasa Bandung. 199-228.
- Tomaszewska, M.W., I.K. Sutarna, I.G. Putu dan T.D. Chaniago. 1991. *Reproduksi dan Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 27-43.
- Trisnaati, M. 2004. *Separasi Ekstrak Serum Kuda Bunting Dengan Sephadex G-25 Untuk Superovulasi Pada Mencit*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 11-12 ; 23-26.
- Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 551-583
- Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Fayer-Husken. 1989. *Influence of Serum and Fertilization In Vitro*. *J. Gamete Research*. 23: 189-201.
- Younis, A. I, K. A. Zuelke, K. M. Harper, M. A. L. Oliveira and B. G. Brackett. 1991. *In Vitro Fertilization of Goat Oocyte*. *J. Biol. Of Reprod*. 44: 1177-1182.

Lampiran 1. Data Jumlah Oosit yang Dibuahi, Embrio yang Dihasilkan dan Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan *In Vitro*.

Ulangan	Perlakuan											
	a ₀ b ₀			a ₀ b ₁			a ₁ b ₀			a ₁ b ₁		
	jumlah oosit	jumlah embrio	%	jumlah oosit	jumlah embrio	%	jumlah oosit	jumlah embrio	%	jumlah oosit	jumlah embrio	%
1	10	4	40,0	10	2	20,0	10	2	20,0	8	2	25,0
2	10	2	20,0	10	2	20,0	10	2	20,0	8	2	25,0
3	10	4	40,0	10	2	20,0	10	6	60,0	10	2	20,0
4	10	4	40,0	12	2	16,6	6	4	66,6	8	2	25,0
5	10	2	20,0	10	3	30,0	10	8	80,0	10	6	60,0
6	20	2	20,0	10	2	20,0	8	2	25,0	8	6	75,0
7	10	6	60,0	10	5	50,0	10	7	70,0	10	6	60,0
8	12	6	50,0	10	6	60,0	8	6	75,0	10	6	60,0
9	11	5	45,4	11	4	36,3	11	7	63,6	9	5	55,5
Rata-rata			6,06			5,69			6,76			6,41
SD			0,74			0,80			1,16			0,99

**Lampiran 2. Transformasi arcsin \sqrt{y} Rata-rata Jumlah Embrio Hasil
Pembuahan *In Vitro*.**

Ulangan	Perlakuan			
	a_0b_0	a_0b_1	a_1b_0	a_1b_1
1	6,26	5,15	5,15	5,48
2	5,15	5,15	5,15	5,48
3	6,26	5,15	7,13	5,15
4	6,26	4,90	7,40	5,48
5	5,15	5,76	7,97	7,13
6	5,15	5,15	5,48	7,75
7	7,13	6,71	7,54	7,13
8	6,71	7,13	7,75	7,13
9	6,51	6,09	7,27	6,94
Rata-rata	6,06	5,69	6,76	6,41
SD	0,74	0,80	1,16	0,99

Lampiran 3. Total untuk Tiap Perlakuan Umur Serum Kuda Bunting dan Perlakuan Ekstrak dan Non Ekstrak

a \ b	b ₀	b ₁	Total
a ₀	54,58	51,19	105,77
a ₁	60,84	57,67	118,51
Total	115,42	108,86	224,28

Keterangan :

a: umur serum kuda bunting

b : laku

a₀ : 2,5 bulan

b₀ : ekstrak

a₁ : 3,5 bulan

b₁ : non ekstrak

Menghitung jumlah kuadrat :

$$FK = \frac{(224,28)^2}{9(2 \times 2)} = \frac{50301,5184}{36}$$

$$= 1397,2644$$

$$JK \text{ Total} = 6,62^2 + 5,15^2 + 6,6^2 + \dots + 7,13^2 + 6,94^2 - 1397,2644$$

$$= 33,6444$$

$$JK \text{ Perlakuan} = \frac{54,58^2 + 51,19^2 + 60,84^2 + 57,67^2}{9} - 1397,2644$$

$$= 5,7053$$

$$JK \text{ a} = \frac{105,77^2 + 118,51^2}{18} - 1397,2644$$

$$= 4,5085$$

$$JK \text{ b} = \frac{115,42^2 + 108,86^2}{18} - 1397,2644$$

$$= 1,1954$$

$$JK \text{ ab} = JK \text{ Perlakuan} - JK \text{ a} - JK \text{ b}$$

$$= 5,7053 - 4,5085 - 1,1954$$

$$= 0,0014$$

$$JK \text{ Sisa} = JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$$

$$= 33,6444 - 5,7053$$

$$= 27,9391$$

$$\begin{aligned} KTP &= \frac{JKP}{ab-1} \\ &= \frac{5,7053}{4-1} \\ &= 1,9018 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} KT a &= \frac{JK a}{a-1} \\ &= \frac{4,5085}{1} \\ &= 4,5085 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} KT b &= \frac{JK b}{b-1} \\ &= \frac{1,1954}{1} \\ &= 1,1954 \end{aligned}$$

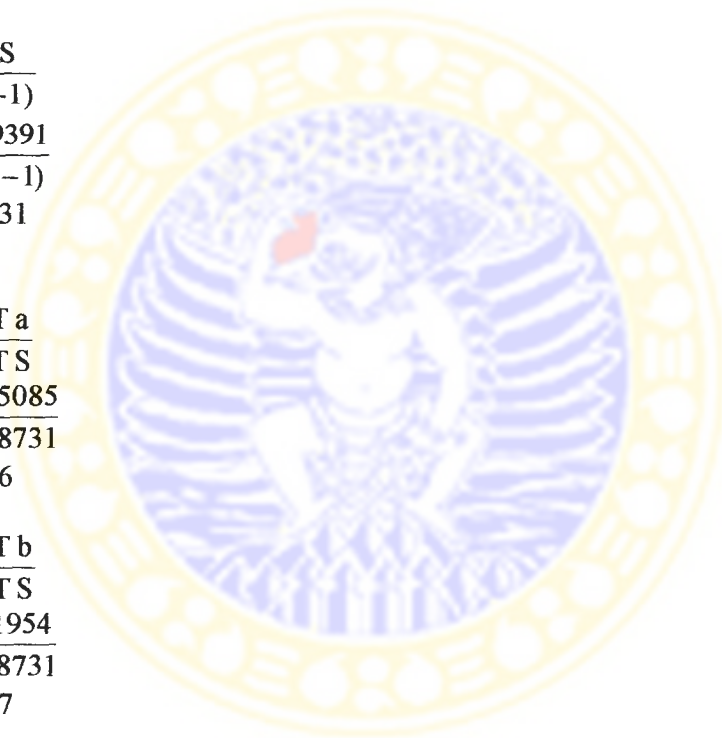
$$\begin{aligned} KT ab &= \frac{JK ab}{(a-1)(b-1)} \\ &= \frac{0,0014}{1} \\ &= 0,0014 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} KTS &= \frac{JKS}{t(n-1)} \\ &= \frac{27,9391}{4(9-1)} \\ &= 0,8731 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Fhit a &= \frac{KT a}{KTS} \\ &= \frac{4,5085}{0,8731} \\ &= 5,16 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Fhit b &= \frac{KT b}{KTS} \\ &= \frac{1,1954}{0,8731} \\ &= 1,37 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Fhit ab &= \frac{KT ab}{KTS} \\ &= \frac{0,0014}{0,8731} \\ &= 0,001 \end{aligned}$$



Lampiran 4. Hasil Sidik Ragam Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan *In Vitro*.

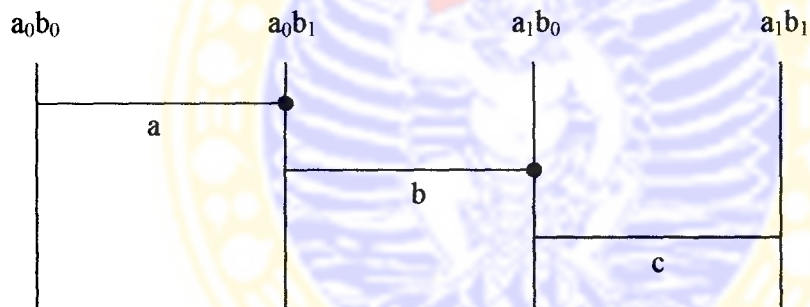
S.K	d.b	J.K	K.T	Fhit	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	3	5,7053	1,9018			
a	1	4,5085	4,5085	5,16*	4,15	7,50
b	1	1,1954	1,1954	1,37	4,15	7,50
ab	1	0,0014	0,0014	0,001	4,15	7,50
Sisa	32	27,9391	0,8731			
Total	35	33,6444				



Lampiran 5. Hasil Uji BNT Rata-rata Jumlah Embrio Hasil Pembuahan *In Vitro* Akibat Pengaruh Umur Serum Kuda Bunting

Perlakuan	Rata-rata (x)	Beda			BNT 5%
		(x- a ₀ b ₁)	(x- a ₀ b ₀)	(x- a ₁ b ₁)	
a ₁ b ₀ ^a	6,76	1,07*	0,7*	0,35	0,63
a ₁ b ₁ ^{ab}	6,41	0,72*	0,35		
a ₀ b ₀ ^{bc}	6,06	0,37			
a ₀ b ₁ ^c	5,69				

$$\text{BNT 5\%} = t_{5\% (32)} \times \sqrt{\frac{2 \times 0,8731}{2 \times 9}} = 2,037 \times 0,3114 = 0,63$$



Lampiran 6. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Media Pencuci Oosit

Bahan TL HEPES stock dalam 500 ml

NaCl	3,300 g
KCl	0,120 g
NaHCO ₃	0,084 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,028 g
Atau anhidrous	0,024 g
Na laktat	930 µl
HEPES	1,200 g
Penisillin	0,032 g
Phenol merah	0,005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,150 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,050 g

Buat pH menjadi 7,4, osmolaritas 255-270 mOsm. Saring dengan filter miliphore kemudian masukkan kedalam botol steril. Simpan pada freezer 4° C (dapat tahan selama 1-2 minggu dalam penyimpanan). Tambahkan Na piruvat, gentamisin dan BSA pada saat akan digunakan.

Media OWS atau TL HEPES (media pencuci) dalam 100 ml

TL HEPES Stock	99 ml
Na piruvat	1,0 ml
Gentamisin	50 µl (2,5 mg)
BSA fraksi V	0,3 g

Saring dengan filter miliphore, letakkan dalam waterbath suhu 39° C.

Lampiran 7. Cara Pembuatan Stok Media TC-199 dalam 1000 ml

Tambahkan bubuk TC-199 sebanyak 9,9 gram (dalam 1 bungkus) dengan 900 ml deionized water. Selanjutnya tambahkan sodium bicarbonat (NaHCO_3) 2,2 gram. Larutkan dan buat pH menjadi 7,4 dengan menambahkan larutan NaOH atau HCl.

Pembuatan Media TC-199 untuk maturasi oosit

TC-199 stock	9 ml
BSA	1 ml
Na piruvat	100 μl
Gentamisin	5 μl (250 μg)

Kemudian tambahkan 10 % ekstrak dan non ekstrak serum kuda bunting. Saring dengan filter miliphore 0,22 μm dan simpan dan simpan dalam freezer dan siap digunakan sebagai media maturasi oosit.

Lampiran 8. Komposisi dan Cara Pembuatan Media EBBS Stok**Komposisi bahan kimia dalam g/l**

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,265
MgSO ₄	0,09767
KCl	0,4
NaCl	6,8
NaPO ₄ monobasik	0,122
D-glukosa	1,0
Phenol merah	0,011

Komposisi media pencuci dan kapasitas spermatozoa dan fertilisasi**Komposisi bahan dalam 100 ml/g**

EBSS stock	0,87
BSA	1,25
Na piruvat	0,10
Gentamisin	25 µg/ml
JT Beker (Aquadess)	100 ml

Untuk membuat drop maturasi dengan meneteskan beberapa drop 50 µl pada cawan petri disposibel dan ditutup dengan minyak mineral. Tempatkan pada inkubator selama 2 jam sebelum digunakan maturasi oosit.