



LAPORAN PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III



01 19/01

Judul Penelitian

PROFIL PROTEIN *TRANSFORMING GROWTH FACTOR* PADA OOSIT SAPI : SEBUAH UPAYA MENINGKATKAN KUALITAS PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO*

Oleh :

Widjiati, M. Si., Drh.
Tatik Hernawati M.Kes., Drh.
Sri Mulyati M.Kes., Drh.

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

007907141

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

NOPEMBER 2003

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III

A. Judul penelitian : **Profil Protein *Transforming Growth Factor β* Pada Oosit Sapi : Sebuah upaya meningkatkan kualitas produksi embrio *in vitro*.**

B. Ketua peneliti :

- a. Nama Lengkap dan Gelar : Widjati, M.Si., Drh.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. Pangkat/golongan/NIP : Penata Tk IIIIC/131 877 882
- d. Bidang Keahlian : Biologi reproduksi
- e. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan
- f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C. Tim Peneliti

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jur.	Perguruan Tinggi
1. Widjati, M.Si., Drh.	Biologi reproduksi	FKH/Reproduksi	Universitas Airlangga
2. Tank Hemawati M.Kes., Drh	Inseminasi buatan	FKH/Reproduksi	Universitas Airlangga
3. Sri Mulyati M.Kes., Drh.	Kebidanan	FKH/Reproduksi	Universitas Airlangga

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 6 bln.
 Biaya total yang diusulkan : Rp. 30 000 000,-
 Biaya yang disetujui : Rp. 30 000 000,-

Mengetahui,
 Kepala Fakultas Kedokteran Hewan
 Universitas Airlangga




Prof. Dr. Hrudiono, M.S., Drh.
 NIP. 130 687 297

Ketua Peneliti



Widjati, M.Si., Drh
 NIP. 131 877 882

Menyetujui,
 Direktur Eksekutif LPPH
 Universitas Airlangga



Tjadjik Sri Cahjandarie
 NIP. 131801627

RINGKASAN

JUDUL PENELITIAN **PROFIL. PROTEIN TRANSFORMING GROWTH FACTOR PADA OOSIT SAPI : SEBUAH UPAYA MENINGKATKAN KUALITAS PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO***

KETUA PENELITIAN : WIDJIATI, M Si., Drh.

ANGGOTA PENELITIAN : Tatik Hernawati M.Kes., Drh.
Sri Mulyati M.Kes., Drh.

TAHUN : DESEMBER 2003, 93 Halaman

Penyebab utama rendahnya produksi *in vitro* embrio terhadap blastosis adalah hasil maturasi oosit yang tidak sempurna. Ukuran populasi oosit yang heterogen pada proses maturasi *in vitro* menyebabkan pertumbuhan oosit tidak mencapai kapasitas secara seragam sehingga menyebabkan proses pematangan tidak berjalan sempurna, hal ini akan mempengaruhi perkembangan embrio. Diketahui pada oosit yang mengalami proses maturasi *Transforming Growth Factor* sangat berperan terhadap peningkatan kualitas oosit yang dihasilkan dan selanjutnya juga sangat berpengaruh terhadap angka fertilitas

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui hubungan profil fraksi protein *TGF β* pada oosit dari berbagai ukuran diameter permukaan folikel yang disintesis selama proses maturasi oosit secara *in vitro* terhadap kualitas oosit, angka fertilitas dan viabilitas embrio. Selain itu untuk memperoleh data karakterisasi fraksi protein *TGF β* dari oosit hasil isolasi dari berbagai ukuran permukaan diameter folikel yang disintesis selama proses maturasi oosit secara *in*

in vitro. Manfaat yang diharapkan adalah untuk memperoleh dasar pengetahuan secara molekuler reproduksi tentang peran *Transforming Growth Factor β* terhadap keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro*, memberikan pertimbangan untuk isolasi *Transforming Growth Factor β* untuk keperluan kultur dalam rangka untuk produksi embrio *in vitro*. Selain untuk optimalisasi produksi sapi dengan pemanfaatan limbah rumah potong hewan.

Metode penelitian ini oosit dikoleksi dari folikel yang ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm. Selanjutnya oosit dimaturasi dalam medium TCM 199 yang ditambah 5 μg / mg LH, 3 % BSA dan 50 μg / ml gentamycin sulfat, kemudian oosit dikultur selama 22 jam pada suhu 38,5° C dalam inkubator 5 % CO₂. Dua puluh dua jam setelah dikultur dilakukan pemeriksaan tingkat kematang oosit dengan pewarnaan aceto orcein 1 %, fertilisasi *in vitro*, pemeriksaan total protein dengan metode biuret, pemeriksaan profil protein *Transforming Growth Factor β* dengan SDS PAGE dan persentase *Transforming Growth Factor β* dengan densitometri.

Hasil penelitian menunjukkan tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm masing-masing mencapai tahap metafase II adalah $0,71 \pm 0,0$, $8,90 \pm 0,36$, $10,20 \pm 0,0$. Kemudian prosentase angka fertilitas untuk masing-masing ukuran folikel 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm adalah 28,72 %, 94,66 % dan 85,90 %. Jumlah sigot yang berkembang mencapai tahap morula untuk masing-masing ukuran

folikel 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm adalah 19,51 %, 51,62 % dan 39,66 %. Profil protein *Transforming Growth Factor β* terlihat pada oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm dan telah mengalami proses maturasi *in vitro*. Demikian juga total protein dan kadar protein *Transforming Growth Factor β* lebih banyak terdapat pada oosit yang sudah mengalami proses maturasi.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan 3-5 mm dan 6-8 mm yang telah mengalami proses maturasi menghasilkan oosit dengan tingkat kematangan yang tinggi dan angka fertilitas yang dihasilkan juga tinggi. Sertis dengan peningkatan jumlah total protein, kadar *Transforming Growth Factor β* dan gambaran profil proteinnya juga lihat jelas pada kelompok ini. Namun viabilitas embrio tidak cukup baik tingkat perkembangannya.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga : Nomor SK Rektor 7181/JO3/PP/2003; No. Kontrak : 64/PL/DUE-Like/UA/2003 HTBAH PROYEK DUE-LIKE Universitas Airlangga, Tahun Anggaran 2003/2006)

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kami panjatkan kehadirannya atas berkah dan karuniaNya sehingga dapat menyelesaikan laporan kegiatan penelitian yang judul **Profil protein *transforming growth factor* mesit sapi : sebuah upaya meningkatkan kualitas produksi embrio *in vitro* dengan baik.**

Penelitian ini dapat terlaksana atas pembiayaan dari dana Hibah Penelitian Proyek Due-Like Batch III tahun anggaran 2003. Oleh karena itu pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya.
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
4. Tim Panitia Proyek Hibah Penelitian Proyek Due-Like Batch III Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

Kami menyadari bahwa penulisan laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang sifatnya menyempurnakan laporan ini sangat kami harapkan. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang bioteknologi reproduksi.

Surabaya, Desember 2003

Tim Penulis

DAFTAR ISI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAR IDENTITAS DAN PEGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Subyek Penelitian	4
1.3. Hasil Yang Diharapkan	5
1.5. Hipotesis Penelitian	6
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
2.1 Tujuan Penelitian	7
2.1.1. Tujuan Jangka Pendek	7
2.1.2. Tujuan Jangka Panjang	7
2.2. Manfaat Penelitian	8
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	9
3.1. Oogenesis	9
3.2. Maturasi (Pematangan) Oosit <i>In Vitro</i>	10
3.3. Seleksi Ukuran Folikel	12
3.4. Evaluasi Oosit	14
3.5. Spermatozoa	15
3.6. Fertilisasi <i>in vitro</i>	16
3.7. <i>Transforming Growth Factor</i>	17

BAB IV	METODE PENELITIAN	19
	4.1. Lokasi Penelitian	19
	4.2. Rancangan Penelitian	20
	4.3. Sampel Penelitian	20
	4.4. Variabel Penelitian	21
	4.5. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian	23
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
	5.1. Tingkat Kematangan (Transformasi Kromosom) Oosit Sapi	28
	5.2. Angka Fertilitas Oosit Sapi	33
	5.3. Viabilitas Embrio Sapi.....	36
	5.4. Protein <i>Transforming Growth Factor</i> Oosit Sapi....	38
	5.5. Total Protein Oosit Sapi	40
	5.6. Kadar Protein <i>Transforming Growth Factor</i> Pada Oosit Sapi.....	41
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	44
	6.1. Kesimpulan	44
	6.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL.

Tabel	halaman
1. Rerata tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi <i>in vitro</i>	28
2. Prosentase angka fertilitas oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm	33
3. Prosentase angka viabilitas embrio sapi dari masing-masing kelompok perlakuan setelah dilakukan kultur <i>in vitro</i>	36
4. Nilai rata-rata total protein oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi <i>in vitro</i>	40
5. Konsentrasi kadar protein <i>Transforming Growth Factor</i> yang terdapat pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi <i>in vitro</i> ..	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Peralatan penelitian	21
2. Bahan-bahan penelitian	21
3. Kerangka penelitian	23
4. Diagram batang tingkat kematangan oosit sapi setelah maturasi <i>in vitro</i>	29
6. Oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi <i>in vitro</i>	29
6. Proses transformasi kromosom pada oosit sapi	30
7. Diagram batang angka fertilitas oosit sapi yang difertilisasi secara <i>in vitro</i>	34
8. Embrio sapi tahap 2 sel hasil fertilisasi <i>in vitro</i>	34
9. Diagram batang angka viabilitas embrio sapi setelah dilakukan kultur secara <i>in vitro</i>	36
10. Protein <i>Transforming Growth Factorβ</i> dengan berat molekul 24 Kda pada oosit sapi	38
11. Diagram batang Total protein pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi <i>in vitro</i>	40
12. Kadar protein <i>Transforming Growth Factor</i> pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi <i>in vitro</i>	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Cara kerja pengukuran total protein oosit sapi	50
2. Cara kerja SDS PAGE	51
3. Cara kerja pewarnaan <i>aceto orange 1%</i>	54
4. Data total protein oosit sapi sesudah dan sebelum maturasi <i>in vitro</i>	56
5. Data tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi <i>in vitro</i>	58
6. Data angka fertilitas oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan fertilisasi <i>in vitro</i>	59
7. Data jumlah perkembangan embrio sapi setelah dilakukan Kultur <i>in vitro</i>	60
8. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap germinal vesicle	61
9. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap germinal vesicle break down	63
10. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap metafase I	65
11. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap metafase II	67
12. Analisis statistik angka fertilitas oosit sapi	69
13. Analisis statistik perkembangan embrio sapi	74
14. Analisis statistik persamaan regresi penentuan berat molekul protein <i>transforming growth factor</i>	82
15. Hasil pemeriksaan kadar protein dengan metode densitometri	84

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kemajuan penelitian dibidang bioteknologi reproduksi belum bisa memenuhi kebutuhan embrio untuk program *transfer embrio* secara kuantitas dan kualitas. Hal ini berdasarkan pada hasil angka kebuntingan apabila embrio yang diproduksi secara *in vitro* apabila ditransfer ke resipien menghasilkan angka kebuntingan yang rendah. Masih rendahnya angka kebuntingan ini perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat pada proses maturasi oosit banyak protein diduga berperan dalam proses pematangan oosit, dan sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui.

Saat ini untuk ruminansia kualitas produksi embrio *in vitro* baik ditingkat nasional maupun internasional masih jauh tertinggal. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa produksi embrio *in vitro* tahap blastosis pada sapi sekitar 30% - 40% (Blerkon *et al*, 1990) dan domba sekitar 36% sedangkan pada kambing hanya 11% (Sukra *dkk*, 1997 ; Boediono *dkk*, 1999). Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Widjiati dan Rumayanti, (2001) diketahui bahwa oosit yang dipanen dari folikel ukuran 3 - 12 mm prosentase jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II adalah 50%, sedangkan oosit yang dikoleksi dari folikel ukuran kurang dari 3 mm hanya mencapai 12%. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas oosit yang dihasilkan secara *in vitro* dari folikel yang berdiameter besar lebih baik dari pada oosit yang dikoleksi dari folikel berdiameter kecil.

Banyak hal yang mempengaruhi rendahnya produksi embrio secara *in vitro* tahap blastosis antara lain adalah sistem kultur dan seleksi ukuran folikel yang belum diperhatikan. Ukuran folikel mempengaruhi ukuran sel kumulus kompleks. Secara molekuler pada setiap variasi ukuran folikel terjadi sintesis protein yang berbeda, yang diduga sangat menentukan oosit setelah maturasi, secara berurutan menentukan kualitas embrio yang akan diproduksi secara *in vitro*. Hal ini diduga bahwa ukuran oosit yang heterogen menyebabkan proses pematangan akhir (kapasitas) tidak berjalan secara sempurna sehingga proses sintesis beberapa protein diduga berkaitan dengan proses maturasi yang disitisi oleh mRNA juga tidak optimum (Hytell *et al* ; 1997). Oosit yang diperoleh dari folikel yang heterogen menyebabkan pertumbuhan oosit secara *in vitro* tidak dapat mencapai perkembangan kapasitas yang seragam dan kondisi ini sangat mempengaruhi proses perkembangan selanjutnya. Oleh karena itu perlu dilakukan penyeragaman pada saat melakukan kultur *in vitro* (Pawshc *et al.*, 1996).

Dari hasil penelitian Widjiati dan Rimayanti (2002) menunjukkan bahwa tingkat fertilitas oosit kambing yang dikoleksi dari beberapa ukuran folikel berpengaruh terhadap angka fertilitas. Folikel ukuran 1 - 2; 3 - 5 dan 6-8 mm menghasilkan angka fertilitas yang bervariasi, secara berurutan adalah 53 : 90 dan 91,6 %.

Dari beberapa hasil penelitian diketahui oosit dengan sel kumulus kompleks yang dikoleksi dari berbagai ukuran folikel apabila dilakukan maturasi memberikan hasil yang berbeda terhadap kualitas oosit yang dihasilkan. Pada proses maturasi terjadi sintesa protein menyebabkan pengeluaran *Transforming*

growth factor β . Yang akan merangsang pelepasan inhibin. Peningkatan inhibin dalam darah akan merangsang pelepasan *Luteinizing Hormon (LH)* sehingga oosit mengalami proses pematangan. Selain itu *Transforming Growth Factor β (TGF β)* mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis DNA sel granulosa dan proses stereodogenesis. *Transforming Growth Factor β* menghambat proliferasi sel dan menginduksi diferensiasi sel. Kerja biologis *Transforming growth factor β* diperantarai oleh reseptor permukaan sel tipe I dan II (T β R I dan T β R II). Reseptor tipe II memiliki domain kinase intraseluler dan didalam ligand *Transforming growth factor β* . Reseptor tipe II berdimerisasi dengan reseptor tipe I untuk menginduksi keluarnya *Transforming growth factor β* . Ekspresi gen reseptor tipe II ini juga dipengaruhi oleh kerja hormon *Folikel Stimulating Hormone (FSH)* dan *Luteinizing Hormone (LH)*. (Breveni et al., 1998; Bieser et al., 1998)

Penambahan hormon pada medium maturasi *in vitro* dimaksudkan untuk meningkatkan kualitas oosit sapi sehingga bisa dilakukan fertilisasi secara *in vitro*, angka fertilitas akan meningkat. Namun dalam kenyataan yang ditemui ditingkat laboratorium, walaupun fertilisasi *in vitro* berhasil cukup sukses, banyak sigot yang tidak berkembang menjadi embrio tahap 4 sel sampai 8 sel dengan kualitas dan morfologi yang baik. Dari banyak penelitian disebutkan bahwa *Transforming growth factor β* sangat mempengaruhi fungsi sel granulosa sehingga apabila terjadi ekspresi prematur atau over ekspresi dari reseptor *Transforming growth factor β* dalam membran sel granulosa akan menyebabkan

perubahan mekanisme kerja *Transforming Growth Factor β* pada sel granulosa. (Godkin and Dore, 1998 ; Osterland and Fried, 2000)

Perubahan mekanisme kerja dari *Transforming Growth Factor β* pada sel-sel granulosa akan mengubah lingkungan mikro intra folikular, yang akan berpengaruh buruk pada kemampuan oosit untuk berkembang menjadi embrio praimplantasi yang normal secara morfologis (Yang and Roy,2001; Leese, 1995) Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gambaran atau profil *Transforming Growth Factor β* pada oosit yang telah mengalami proses maturasi yang dikoleksi dari berbagai ukuran folikel hubungannya dengan kualitas oosit dan peran *Transforming Growth Factor β* pada proses perkembangan sigot secara *in vitro* kaitannya dengan angka fertilitas.

1.2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah profil protein *Transforming Growth Factor β* oosit sapi dari berbagai ukuran diameter permukaan folikel sebelum dan sesudah dilakukan maturasi.

Penelitian ini meliputi beberapa aspek.

1. Maturasi oosit sapi secara *in vitro*.
2. Pemeriksaan profil kromosom atau tingkat kematangan oosit sapi.
3. Fertilisasi *in vitro*.
4. Kultur *in vitro*
5. Pemeriksaan total protein oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*

6. Analisis fraksi protein *transforming growth factor (TGF) β* berdasarkan metode SDS PAGE dan densitometri dari hasil isolasi pada setiap tahapan dan ukuran diameter permukaan folikel sebelum maturasi.
7. Analisis fraksi protein *TGF β* berdasarkan metode SDS PAGE dan densitometri dari hasil isolasi pada setiap tahapan dan ukuran diameter permukaan folikel sesudah dilakukan maturasi secara *in vitro*.

1.3. Hasil Yang Diharapkan

Hasil yang ditargetkan dari penelitian ini adalah :

- a. Mengetahui kondisi kematangan oosit yang dikoleksi dari diameter permukaan folikel ukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm berkaitan dengan peran protein *TGF β* yang diproduksi selama proses maturasi.
- b. Mengetahui pengaruh oosit yang dikoleksi dari diameter permukaan folikel ukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm terhadap angka fertilitas berkaitan dengan peran protein *TGF β* yang diproduksi selama proses maturasi.
- c. Mengetahui pengaruh oosit yang dikoleksi dari diameter permukaan folikel ukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm terhadap viabilitas embrio berkaitan dengan peran protein *TGF β* yang diproduksi selama proses maturasi.
- d. Mengetahui profil protein *Transforming Growth Factor β* pada oosit yang belum dimaturasi dan yang sudah dimaturasi secara *in vitro* untuk keperluan kultur.
- e. Mengetahui kadar protein *Transforming Growth Factor β* pada oosit yang belum dimaturasi dan yang sudah dimaturasi secara *in vitro* untuk keperluan kultur.

- f. Mengetahui total protein yang terdapat pada oosit yang belum dan yang sudah mengalami proses maturasi.

1.4. Hipotesis

Transforming Growth Factor β pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm berpengaruh terhadap kualitas oosit hasil maturasi, angka fertilitas dan viabilitas embrio.



BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

2.1.1. Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai adalah :

1. Mengetahui hubungan profil fraksi protein $TGF\ \beta$ pada oosit dari berbagai ukuran diameter permukaan folikel yang disintesis selama proses maturasi oosit secara *in vitro* terhadap kualitas oosit, angka fertilitas dan viabilitas embrio.
2. Memperoleh data karakteristik fraksi protein $TGF\ \beta$ dan oosit hasil isolasi dari berbagai ukuran permukaan diameter folikel yang disintesis selama proses maturasi oosit secara *in vitro*.

2.1.2. Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai adalah :

1. Menghasilkan protein $TGF\ \beta$ secara *in vitro* yang dipakai untuk co-cultur dalam rangka meningkatkan kualitas produksi embrio *in vitro*.
2. Meningkatkan produksi embrio *in vitro* ruminansia besar dan menunjang keberhasilan transfer embrio, sehingga dapat meningkatkan populasi ternak.

2.2. Manfaat Penelitian

- a. Memperoleh dasar pengetahuan secara molekuler reproduksi tentang peran *Transforming Growth Factor β* terhadap keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro*.
- b. Memberikan pertambahan untuk isolasi *Transforming Growth factor β* untuk keperluan kultur dalam rangka untuk produksi embrio *in vitro*.
- c. Optimalisasi produksi sapi dengan pemanfaatan limbah rumah potong hewan.



BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Oogenesis

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

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

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

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

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

Folikel de Graaf berkembang terus yang diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum, pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel theca, yang akan merangsang pelepasan *lutemazing hormone* (LH) sekresi LH ini akan menggerak terjadinya ovulasi. Saat akan terjadi pelepasan polar body I dan ovum memasuki pembelahan meiosis II (Hafez, 1993)

3.2. Maturasi (Pematangan) Oosit *In Vitro*

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

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

Oosit pre ovulasi akan mengalami proses diferensiasi yang ditandai dengan pematangan inti dan sitoplasma, pematangan oosit diinduksi oleh *lutemizing hormone* (LH). Impuls hormon keluar saat inti dari oosit masih pada periode *germinal vesicle* (inti belum berkembang). Begitu terjadi sekresi LH dimulailah perkembangan dari inti yang diikuti oleh perkembangan dari sitoplasma. Beberapa jam setelah LH mencapai puncaknya, inti oosit akan membesar dan bergerak ketepi kemudian melebur, kondisi inilah yang kemudian disebut inti dalam keadaan *germinal vesicle break down*. Selanjutnya akan terjadi pembelahan meiosis menjadi metafase I yang selanjutnya berkembang menjadi metafase II (Supriatna dan Pasaribu, 1992; Gilbert, 1998).

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

Menurut Hafez (1993) oosit yang dimaturasi secara *in vitro* menunjukkan potensi yang sangat rendah terhadap kemampuan fertilisasi dan perkembangan berikutnya. Penambahan hormon kedalam medium maturasi akan meningkatkan

kualitas oosit yang dimaturasi secara *in vitro* sehingga dapat memperbaiki potensi oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrional selanjutnya.

Medium yang digunakan untuk *in vitro maturation* (IVM) berbeda-beda antara laboratorium. Harus diperhatikan bahwa medium kultur pada IVM bisa mempengaruhi oosit untuk mencapai metafase II sehingga mampu menjalani fertilisasi dengan baik. Medium kultur untuk IVM secara garis besar bisa dibagi menjadi media sederhana dan media kompleks. Media sederhana biasanya terdiri dari sistem buffer bikarbonat dengan dasar *physiological saline* yang ditambah pyruvate, laktosa, dan glukosa. Perbedaan yang mendasar dari dua jenis media tersebut terletak pada konsentrasi ion dan konsentrasi sumber energi. Media biasanya ditambah dengan sedikit antibiotik (penicillin, streptomycin, gentamycin). Media kompleks tersusun dari media sederhana yang ditambahkan asam amino, vitamin, purin, dan zat-zat lain. Biasanya kadarnya disamakan dengan kadar dalam serum. Media kompleks yang sering digunakan pada oosit sapi adalah Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) dengan Early's salt, L-Glutamine dan 25mM HEPES yang diberi suplemen 10-20% serum yang di inaktivasi dengan panas (bisa fetal calf serum, calf serum, steer serum, atau estrus cow serum). Media lain yang biasa digunakan adalah Ham's F-10, MEM, 101, CR1aa, Synthetic Bovine Oviductal Fluid Medium dan lain-lain (Duran,1998). Dianjurkan oleh Gordon (1994) untuk menambahkan serum sehingga kondisinya dapat menyerupai maturasi *in vivo*.

Serum sapi birahi (FCS) dan serum kuda birahi (FMS) dapat dipakai sebagai pengganti suplementasi FSH-LH-E2 yang sering dipakai dalam

pematangan oosit sapi. Hal ini disebabkan oleh karena persentase pematangan oosit yang dicapai pada masing-masing suplementasi tidak berbeda secara nyata (Mahaputra, 1996).

Keberhasilan maturasi oosit selain tergantung dari media dan zat aditifnya, juga tergantung kualitas inkubator CO₂ yang digunakan. Inkubator yang baik akan dapat mendistribusikan dan mengatur konsentrasi CO₂ secara tetap dan merata dan dengan suhu yang tidak terlalu banyak berubah sekitar 38°C. Inkubasi dalam media TCM 199 selama 18 dan 24 jam tidak ada perbedaan bermakna terhadap angka maturasi yaitu masing-masing 71% dan 76% (Povokief *et al*, 1992)

3.3. Seleksi Ukuran Folikel

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

Oosit yang dikoleksi dari folikel yang ukuran diameter kurang dari 100µm, aktifitas metabolisme tidak berlangsung secara maksimal. Dimana *intermediate glyentie*, amino acid, ATP dan molekul-molekul lain yang diproduksi

oleh sel-sel kumulus yang mungkin dikeluarkan oleh oosit tidak mampu mendukung proses pematangan oosit secara penuh. Proses metabolisme ini sangat penting dalam menyediakan energi untuk memasuki tahap maturasi selanjutnya (Rieger dan Luskutiff, 1994).

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

3.4. Evaluasi Oosit

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

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

3.5. Spermatozoa

Spermatozoa dibentuk dalam testis, tepatnya di dalam tubulus seminiferus dalam proses spermatogenesis. Proses spermatogenesis terdiri dari empat tahap, yaitu tahap proliferasi yaitu ditandai dengan adanya granulosa akrosom di dalam idiosom spermatid; tahap tumbuh ditandai dengan granulosa akrosom membungkus satu kutub inti; tahap masak atau akrosom yaitu bila akrosom terbentuk dengan sempurna dan tahap transformasi atau metamorfosa atau penderewasaan. Tahap proliferasi sejak pra lahir sampai beberapa waktu setelah fetus dilahirkan kemudian dilanjutkan lagi setelah individu menginjak umur dewasa kelamin (Hafez, 1987).

Bakal sel kelamin yang sudah ada pada membran basaf dari tubulus seminiferus melepaskan diri dan mengalami pembelahan mitosis membentuk spermatogonia. Pada tahap tumbuh spermatogonia membelah secara mitosis membentuk spermatosit primer. Pada tahap masak spermatosit primer mengalami pembelahan meiosis membentuk spermatosit sekunder kemudian membelah secara mitosis lagi menjadi spermatid. Pada tahap metamorfosa spermatid berubah menjadi spermatozoa, proses ini disebut dengan spermiogenesis. Ciri-ciri dari proses spermiogenesis adalah aparat golgi pada tudung anterior atau akrosom yang mengandung enzim yang dibutuhkan untuk penetrasi korona radiata dan zona pelusida pada proses fertilisasi; inti spermatid yang mengandung kode genetik menjadi kepala sperma, plasma membran menjadi selubung tubuh sperma dan mitokondria mengumpul di bagian ekor. Ekor spermatozoa normal dibagi menjadi bagian tengah (Mid piece), bagian utama (main piece) dan bagian akhir (end piece) (Gilbert, 1988)

3.6. Fertilisasi *In Vitro*

Pada dasarnya fertilisasi *in vitro* tidak berbeda dengan fertilisasi *in vivo* yaitu merupakan satu proses peleburan antara ovum dan spermatozoa sehingga menghasilkan sel baru yang disebut dengan zigot (Hafez,1987). Pengertian fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi huatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan ovum maupun spermatozoa diluar tubuh hewan atau didalam suatu bentuk sistem biakan sel. Awal penelitian tentang fertilisasi *in vitro* dimulai ketika M.C.Chang pada tahun 1959 berhasil mendapatkan anak kelinci yang berasal dari ovum yang dikumpulkan dari tuba falopii induk kelinci, kemudian dibuahi oleh spermatozoa dalam tabung dan embrio yang diperoleh ditransfer pada induk resipien (Hafez,1987).

Proses fertilisasi *in vitro* agar berhasil membutuhkan ovum yang sudah matang dan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi. Selain itu juga memerlukan kondisi lingkungan menyerupai kondisi fertilisasi *in vivo* yang meliputi temperatur, media, PH, hormonal , nutrisi dan kondisi lain yang juga dapat mempengaruhi (Monk, 1987)

Untuk keperluan fertilisasi *in vitro* spermatozoa yang telah diejakulasikan tidak dapat langsung digunakan untuk membuahi ovum, spermatozoa harus mengalami proses kapasitasi, yaitu sebuah proses pendewasaan spermatozoa sebelum melakukan pembuahan pada ovum yang secara normal berlangsung didalam saluran reproduksi hewan betina selama 30 menit hingga 10 jam atau lebih, tergantung pada spesies(Monk, 1987). Dengan demikian spermatozoa mampu menembus sel kumulus yang membungkus ovum dan mendekati zona

pelucida sehingga terjadi reaksi zona, kemudian kepala spermatozoa menyentuh membran vitelina dan ovum menjadi aktif untuk memulai perubahan morfologis dan biokimia. Lebih lanjut terjadi fusi dan terlepaslah polar body II. Kemudian terjadi perkembangan embrio yang ditandai dengan perkembangan dan pertumbuhan sel-sel blastomer (Trousan *et al.*, 1993).

3.7. *Transforming Growth Factor*

Transforming growth factor β (TGF- β) termasuk famili polipeptida bermata rantai disulfida yang strukturnya saling berikatan, dimerik, yang meliputi lima TGF- β isoform, activin, inhibins, zat penghambat Mullerian, protein morfogenik tulang dan produk produk dari *Xenopus Vgf* dan *Drosophilla decapentaplegic (dpp)* genes. Pada mamalia, tiga isoform TGF- β (TGF- $\beta 1$, - $\beta 2$ dan - $\beta 3$) telah diidentifikasi. Beberapa TGF- β berupa cytokines multifungsional yang mempengaruhi banyak proses selular. Mereka dapat meregulasi proliferasi dan diferensiasi sel secara positif atau secara negatif bergantung pada tipe sel dan telah diimplikasikan dalam banyak peristiwa fisiologis seperti angiogenesis, fungsi imun, steroidogenesis dan perombakan (tissue remodelling) dan perbaikan jaringan. Karena semua peristiwa ini berlangsung dalam endometrium uterine selama siklus estrus atau siklus menstruasi dan selama kehamilan, beberapa TGF- β mempunyai peran untuk meregulasi beberapa fungsi reproduksi. Efek biologis dari TGF- β diperantari atau dimediasi melalui interaksi dengan reseptor permukaan sel, tipe I, II dan III. Reseptor tipe I dan II berupa protein transmembran yang mengandung domain cytoplasmik serin:threonin kinase. TGF- β mengikat reseptor tipe II tetapi tidak mengikat reseptor tipe I. Reseptor tipe I

mengenali reseptor tipe II pengikat ligand yang dengannya ia membentuk kompleks heteromerik. Reseptor tipe I kemudian mengalami fosforilasi, yang mungkin dikatalisis oleh kinase tipe II. Signal reseptor tipe I melibatkan fosforilasi satu atau lebih protein sitoplasmik yang disebut sebagai Smads, pembentukan kompleks Smads -2,-3, dan -4, dan translokasinya ke inti dan asosiasinya dengan faktor-faktor transkripsi. Reseptor tipe III adalah proteoglycan tanpa domain cytoplasmic kinase dan dilibatkan dalam penyajian TGF- β ke reseptor tipe II (James and Dore, 1998).

Transforming Growth Factor β mempengaruhi fungsi sel ovarium pada berbagai spesies. Interaksi ligand-ligand ini terjadi selama folikulogenesis dan *Epidermal Growth Factor (EGF)* mempengaruhi kerja TGF- β pada folikel preantral dengan memodulasi transkripsi dan translasi reseptor TGF- β . Untuk menentukan apakah EGF mempengaruhi mRNA reseptor TGF- β dan tingkat protein pada sel-sel granulosa selama folikulogenesis, dapat dilakukan dengan cara folikel preantral hamster dikultur dengan dan tanpa adanya EGF, dan tingkat protein diamati dengan RT-PCR kuantitatif dan immunoblotting. Selanjutnya, kenaikan signifikan dalam tingkat mRNA reseptor TGF- β tampak pada folikel preantral yang lebih besar. Secara fungsional TGF- β melemahkan sintesis DNA yang diinduksi EGF untuk folikel dan tanpa mempengaruhi produksi progesteron. Dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara EGF dan TGF β membentuk suatu mekanisme regulasi yang penting untuk folikulogenesis preantral. Respon folikel terhadap TGF β tergantung pada status perkembangan folikel (Yang and Roy , 2001)

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi laboratorium secara eksperimental dilakukan untuk menguji hipotesis melalui beberapa tahapan penelitian

- 1 Melakukan maturasi oosit sapi berdasarkan ukuran folikel dengan diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm.
2. Pemeriksaan tingkat kematangan oosit sapi dengan metode pewarnaan arceo orcein untuk mengetahui kualitas oosit sapi
3. Melakukan fertilisasi *in vitro* terhadap kualitas oosit.
4. Melakukan kultur *in vitro* untuk mengetahui viabilitas embrio
5. Melakukan isolasi fraksi protein oosit dari ukuran folikel 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm sebelum dilakukan maturasi.
6. Melakukan isolasi total protein oosit dari folikel ukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm sebelum dan setelah dilakukan maturasi
- 7 Analisis fraksi protein *TGF β* dari oosit berdasarkan metode SDS PAGE pada setiap tahapan dan ukuran diameter permukaan folikel sebelum maturasi

4.1. Lokasi Penelitian

- 1 Rumah Potong Hewan (RPH) Krian Sidoarjo untuk memperoleh ovarium.
- 2 Laboratorium Fertilisasi *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan untuk melakukan koleksi oosit, maturasi oosit, fertilisasi *in vitro* dan kultur *in vitro*.

3. **Laboratorium Biologi Molekuler untuk Analisis fraksi protein sebelum dan setelah maturasi**
4. **Analisis kadar fraksi protein TGF dari oosit berdasarkan metode densitometri pada setiap tahapan dan ukuran diameter permukaan folikel sebelum dan setelah maturasi.**

4.2. Rancangan Penelitian

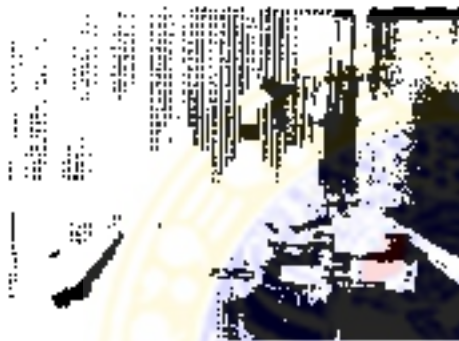
Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan diusahakan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium. Hari pengerjaan dianggap sebagai ulangan.

4.3. Sampel Penelitian

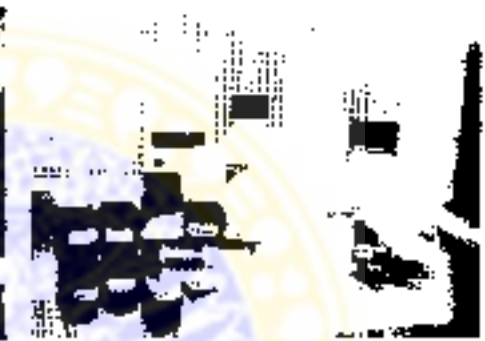
Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ovarium sapi yang diambil dari rumah potong hewan Krian Sidoarjo. Ovarium di bawa ke laboratorium Fertilisasi *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan koleksi oosit berdasarkan ukuran permukaan diameter folikel masing-masing yaitu 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm. Selanjutnya di maturasi dan fertilisasi *in vitro*. Selain itu oosit yang belum di maturasi dan yang sudah di maturasi dilakukan analisis fraksi protein untuk mengetahui total protein, profil protein dan kadar TGF di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Untuk lebih jelasnya sampel penelitian dibagi menjadi 6 kelompok yaitu :

- P1 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P2 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P3 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P4 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P5 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P6 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*



Gambar 1. Peralatan penelitian



Gambar 2. Bahan-bahan penelitian

4.4. Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

1. Oosit sapi yang dikoleksi dari folikel yang diameter permukaan berukuran 1-2 mm dan sudah dilakukan maturasi.
2. Oosit sapi yang dikoleksi dari folikel yang diameter permukaan berukuran 3-5 mm dan sudah dilakukan maturasi.
3. Oosit sapi yang dikoleksi dari folikel yang diameter permukaan berukuran 6-8 mm dan sudah dilakukan maturasi.

Variabel Tergantung

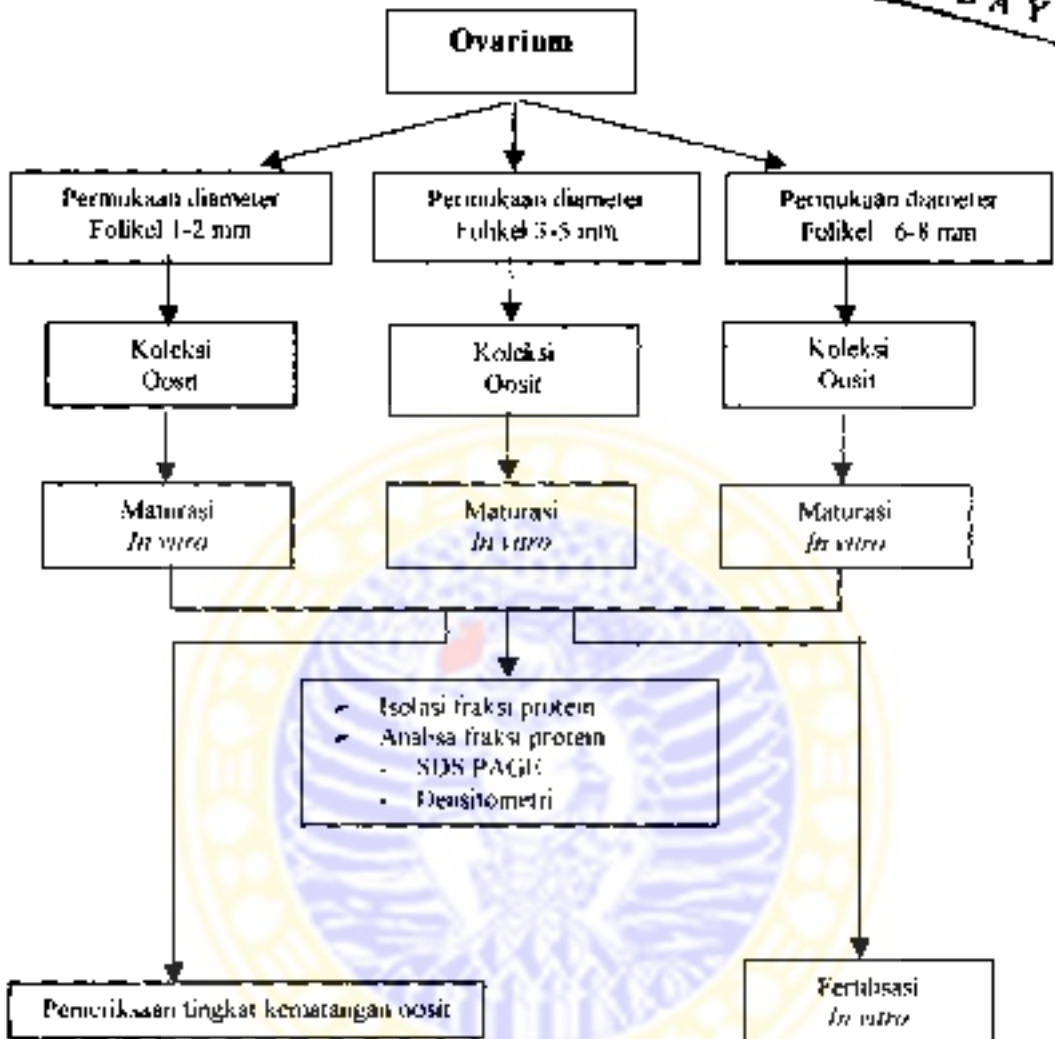
Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Tingkat kematangan oosit sapi setelah dilakukan maturasi *in vitro*.
2. Angka fertilitas setelah oosit setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*
3. Karakter protein *TGF β* dari oosit berdasarkan kadar dan berat molekul berdasarkan metode biuret dan SDS PAGE

Variabel Terkontrol

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

Kerangka Penelitian



Gambar 3. Kerangka penelitian

4.5. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

a. Koleksi Oosit

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan Krian dan disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 µg/ml, pada suhu 30-35°C. Oosit diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran G 18 yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml Phosphate Buffer Saline

(PBS) yang telah diberi tambahan 0,3% Bovine Serum Albumine (BSA) dan 50 µg/ml gentamycin. Aspirasi dilakukan pada folikel dengan peneukaan diameter berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm. Oosit yang memiliki lapisan kumulus kompleks dicuci secara berturut-turut sebanyak 3 kali di dalam medium Phosphate Buffer Saline (PBS) dan 2 kali di dalam Tissue Buffer Culture (TCM) 199 dan dikelompokkan berdasarkan ukurannya.

b. Maturasi Oosit

Untuk proses maturasi oosit dipergunakan medium TCM yang ditambahkan 0,01 µg/ml FSH, 0,01 µg/ml LH, 5% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Sepuluh sampai empat puluh oosit berdasarkan ukurannya di kultur dalam 100 µl medium tetes dan ditutup dengan mineral oil. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38°C didalam inkubator CO₂ 5% selama 22 jam (Pawshé *et al.*, 1996).

Oosit yang telah matang berdasarkan kelompok perlakuan masing-masing selanjutnya dibagi 3 bagian untuk pemeriksaan tingkat kematangan oosit dengan metode pewarnaan aceto occin, untuk analisa fraksi protein dan dilakukan fertilisasi *in vitro* untuk mengetahui angka fertilitas secara *in vitro*.

c. Pemeriksaan Tingkat Kematangan Oosit

22 jam setelah proses maturasi oosit, oosit berdasarkan kelompok masing-masing diletakkan pada gelas obyek, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan difiksasi di dalam asam acetat : etanol (1 : 3) selama 2- 3 hari. Selanjutnya oosit yang telah difiksasi diwarnai dengan pewarna aceto occin 1% melalui salah satu sisi gelas penutup dan didiamkan 2-3 menit. Kemudian oosit yang telah terwarnai, dibilas dengan larutan penghilang warna sambil cairan dihisap dengan tissue supaya preparat menjadi kering. Kemudian preparat diamati dibawah mikroskop interved untuk menentukan oosit yang berkembang menjadi *Germinal*

Vesicle (GV), *Germinal Vesicle Break Down (GVBD)*, *Metafase I* dan *Metafase II* berdasarkan kelompok perlakuan masing-masing.

d. *Fertilisasi In Vitro*

Untuk fertilisasi *in vitro* dipergunakan semen sapi segar, semen dikoleksi dengan mempergunakan vagina buatan. Setelah dievaluasi standar, semen dicuci dalam 6 ml medium fertilisasi yaitu medium TCM 199 yang diberi suplementasi glutamin, 20 µg/ml heparin, 0,3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin. Endapan spermatozoa diencerkan sampai dengan konsentrasi 5×10^6 spermatozow/ml. Oosit yang telah matang berdasarkan ukurannya dimasukkan ke dalam 100 µl suspensi sperma yang telah ditulup mineral oil. Fertilisasi dilakukan selama 16 jam di dalam inkubator CO₂ 5% suhu 38,5⁰C (Shamsudin *et al.*, 1993)

e. *Kultur In Vitro*

Sigot yang diperoleh dari hasil fertilisasi *in vitro* selanjutnya dipindahkan dalam drop kultur dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % suhu 38⁰C dan diamati tiap 24 jam sampai embrio mencapai tahap blastosis.

f. *Isolasi Fraksi Protein Dari Oosit Yang Diambil Dari Berbagai Ukuran Permukaan Diameter Folikel*

Oosit yang telah dikoleksi dilarutkan di dalam larutan PBS yang telah ditambah 0,05 mM PMSF (Phenyl Metil Sulfonil Flouride), yang berfungsi sebagai antibiotik. Setelah itu oosit dicuci dengan PBS (Phosphat Buffer Saline) dengan (2-4⁰C) steril, dengan cara memindahkan oosit ke dalam cawan petri yang sudah berisi PBS. Selanjutnya oosit dipindah ke dalam larutan PBS. Oosit dimasukkan ke dalam eppendorf yang sudah berisi PBS mengandung EDTA dan Tween 100 dan divortek. kemudian disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm 4⁰C

selama 30 menit. Supernatan ditampung sebagai fraksi protein (fp) selanjutnya ditambah 20 mM Tris-Cl 200 μ l. dan disimpan dalam freezer suhu -10°C dan siap digunakan sebagai bahan isolat tp

g. **Analisa Fraksi Protein (fp)**

g.1. **Penentuan Berat Molekul Fraksi Protein TGF beta dengan SDS Page**

Persiapan gel (lampiran 2)

Injeksi sampel (lampiran 2)

Pewarnaan dan pencucian gel. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining 30-60 menit. Penghitungan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan destaining sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis difoto

Penentuan berat molekul. Dengan membandingkan hasil elektroforesis fraksi protein dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor) dan masing-masing pita dimana :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian dibuat kurva standar protein marker dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul fraksi protein ditentukan dengan interpolasikan pada kurva standar (Goers and John, 1993).

h. **Analisis Data**

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Data yang diperoleh dari tingkat kematangan oosit, angka fertilisasi, analisis fraksi protein TGF diuji

dengan anova, bila diantara perlakuan terdapat perbedaan yang nyata dilakukan uji lebih lanjut dengan Duncan (Steel and Torrie, 1991)



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Tingkat Kematangan (Transformasi Kromosom) Oosit Sapi

Data tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi *in vitro* dan dilakukan pewarnaan dengan aceto orcein dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

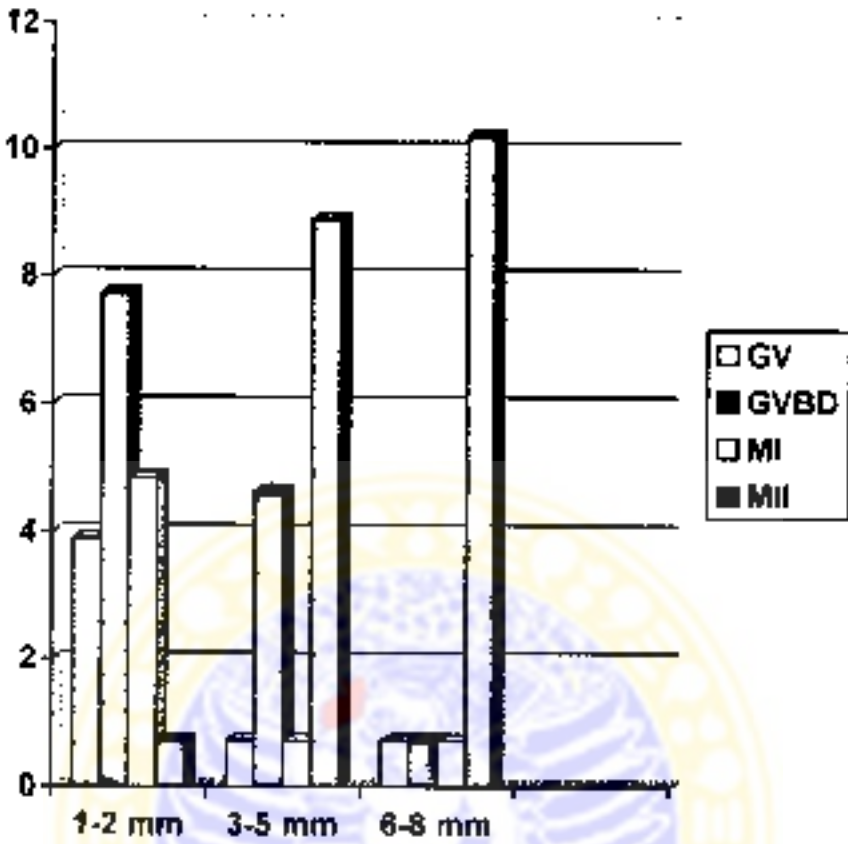
Tabel 1. Rerata tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi *in vitro*

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah oosit	Pengamatan			
		GV	GVBD	MI	MII
1-2 mm	116	3,89 ± 2,13 ^b	7,72 ± 0,95 ^c	4,83 ± 0,43 ^h	0,71 ± 0,00 ^a
3-5 mm	84	0,71 ± 0,00 ^a	4,62 ± 0,65 ^h	0,71 ± 0,00 ^a	8,90 ± 0,36 ^b
6-8 mm	50	0,71 ± 0,00 ^a	0,71 ± 0,00 ^a	0,71 ± 0,00 ^a	10,02 ± 0,00 ^c

Keterangan : huruf yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

- GV : Germinal Vesicle
 GVBD : Germinal vesicle Break Down
 MI : Metafase I
 MII : Metafase II

Gambaran tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari dengan diameter permukaan berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi *in vitro* dapat dilihat pada grafik batang dibawah ini :



Gambar 4 Diagram batang tingkat kematangan oosit sapi setelah maturasi *in vitro*



Gambar 5. Oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*



Gambar 6. Proses transformasi kromosom pada oosit sapi

Berdasarkan analisis statistik dengan anova menunjukkan bahwa tingkat kematangan atau profil transformasi kromosom oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi *in vitro* berbeda nyata ($p < 0,05$) diantara 3 kelompok ukuran tersebut. Hal ini dilihat dari jumlah oosit yang berkembang mencapai tahap *germinal vesicle*, *germinal vesicle break down*, metafase I dan metafase II.

Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm pada tahap perkembangan cukup banyak berada pada tahap *germinal*

vesicle (GV) yaitu $(3,89 \pm 2,13^b)$, kemudian jumlah ini meningkat ketika mencapai tahap *germinal vesicle break down (GVBD)* oosit yaitu $(4,83 \pm 0,43^b)$. Oosit dari kelompok ini juga mampu mencapai tahap metafase I, namun ketika memasuki tahap metafase II terjadi penurunan yang sangat dratis yaitu hanya sekitar $0,71 \pm 0,0^a$.

Penurunan jumlah oosit dari kelompok 1-2 mm mencapai tahap metafase II menunjukkan tingkat kualitas oosit tersebut sangat rendah, hal disebabkan oosit yang dikoleksi dari folikel ukuran kecil tidak mempunyai kemampuan untuk menyelesaikan proses meiosis atau yang lebih dikenal dengan *meiotic competence*. *Meiotic competence* dapat tercapai pada tahap akhir pertumbuhan folikel. Oosit yang awalnya mencapai tahap GVBD selanjutnya berkembang mencapai tahap metafase II. Hanya oosit yang mempunyai *meiotic competence* yang bisa mencapai tahap metafase II, hal ini berhubungan dengan perubahan pola sintesa protein (Crozet *et al.*, 2000 ; Mousa, 2002)

Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan 6-8 mm jumlah yang mencapai GV dan Metafase I tidak berbeda nyata yaitu $0,71 \pm 0,0^a$, sedang yang mencapai tahap GVBD dan metafase II diantara kedua kelompok tersebut berbeda nyata. Oosit dari kelompok ukuran 6-8 mm lebih baik kualitasnya dibanding dengan oosit dari kelompok ukuran 3-5 mm dilihat dari jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II yaitu $10,02 \pm 0,0^f$

Proses pematangan inti berjalan bila sudah ada LH surge. Selama proses maturasi berlangsung, melibatkan banyak faktor yang berperan untuk sintesa protein disamping adanya growth factor seperti *Insulin Like Growth Factor*,

Epidermal Growth Factor, *Transforming Growth Factor* dan lain-lain yang semuanya saling mendukung sehingga oosit mempunyai *meiotic competence*. Selama proses meiosis oosit diatur oleh *maturational promoting factor* (MPF), berupa protein kinase yang aktivitasnya memicu reaksi yang menyebabkan membran inti menghilang sehingga proses pematangan inti dimulai (Hendriksen *et al.*, 2000)

Meiotic competence erat hubungannya dengan ukuran oosit dalam arti berhubungan dengan ukuran folikel. Ukuran folikel antral mempunyai *meiotic competence* yang spesifik. Oosit sapi ukuran 2-3 mm mempunyai kemampuan menyelesaikan tahap GVBD dan meiosis. Menurut Abdou (2001) oosit yang berasal dari folikel besar lebih mampu berkembang dari pada oosit dari folikel sedang, karena folikel besar mampu menyediakan lingkungan makro yang bisa menunjang kualitasnya.

Menurut Yang and Roy (2001) tidak terdapat perbedaan antara folikel sedang (2-5 mm) dan folikel besar (5-8 mm). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian kami bahwa sebenarnya dilihat dengan angka tidak terdapat perbedaan kualitas oosit yang dikoleksi dari folikel sedang dan besar sama-sama tinggi meskipun folikel besar nilainya jauh lebih tinggi. Perlu diingat oosit yang dikoleksi dari folikel besar dari awal memang sudah memasuki tahap pematangan sehingga kemungkinan terjadi *over mature* adalah besar. Hasil penelitian terakhir menunjukkan bahwa oosit dari folikel dominan (>13 mm) menghasilkan oosit dengan kualitas yang tidak selalu terbaik dalam arti jumlah oosit yang mencapai

tahap metafase II cukup tinggi tetapi belum tentu menghasilkan angka fertilitas juga tinggi.

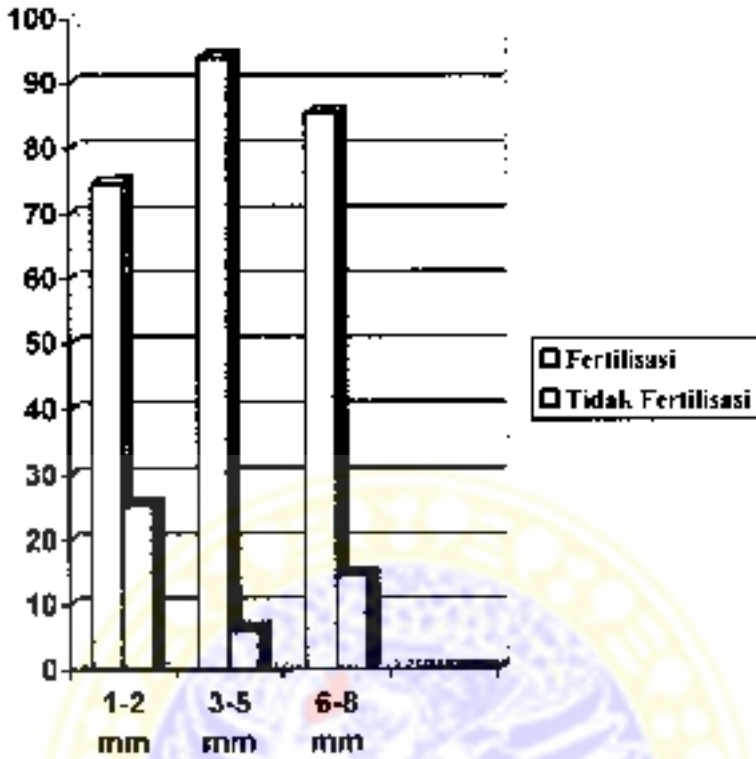
5.2. Angka Fertilitas Oosit Sapi

Data angka fertilitas oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan berukuran 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan fertilisasi *in vitro* dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 2. Prosentase angka fertilitas oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah oosit	Pengamatan (persen)	
		Terjadi fertilisasi	Tidak terjadi fertilisasi
1-2 mm	162	41 (28,72) ^a	121 (71,28) ^b
3-5 mm	66	62 (94,66) ^c	4 (5,34) ^d
6-8 mm	68	68 (85,90) ^e	10 (14,10) ^f

Keterangan : huruf yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 7 Diagram batang angka fertilitas oosit sapi yang difertilisasi secara *in vitro*



Gambar 8 Embrio sapi tahap 2 sel hasil fertilisasi *in vitro*

Berdasarkan uji statistik dengan anova diketahui bahwa oosit yang difertilisasi secara *in vitro* terdapat perbedaan yang nyata diantara ketiga

kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Dari hasil uji oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm mencapai angka fertilitas tertinggi yaitu ($94,66 \pm 8,39^h$) dibandingkan dengan kelompok ukuran 6-8 mm yaitu ($85,90 \pm 16,81^h$) walaupun setelah dilakukan analisis statistik tidak berbeda nyata diantara kedua kelompok perlakuan tersebut. Angka fertilitas terendah terdapat pada kelompok oosit ukuran 1-2 mm.

Angka fertilitas terbaik terdapat pada kelompok oosit ukuran 3-5 mm walaupun secara statistik tidak berbeda dengan kelompok 6-8 mm. Hal ini menunjukkan bahwa oosit dalam keadaan *over mature* akan menghambat proses penetrasi spermatozoa kedalam oosit sehingga akan menurunkan angka fertilitas. Hal ini terlihat pada kelompok oosit ukuran 6-8 mm walaupun secara statistik tingkat kematangannya lebih tinggi dari kelompok ukuran 3-5 mm, ketika memasuki proses fertilisasi mengalami penurunan karena adanya keadaan *over mature*.

Ukuran folikel berpengaruh terhadap angka fertilitas setelah oosit dilakukan fertilisasi. Hal ini berhubungan dengan beberapa faktor terkait seperti kondisi nutrien, ion, makromolekul, hormon, growth factor, oksigen dan lain-lain yang menunjang kondisi terjadinya fertilisasi selain faktor oosit dan spermianya sendiri. Oosit yang dipoleh dari folikel besar dan sedang diketahui mengandung Transforming growth factor yang berpengaruh secara signifikan terhadap tingginya angka fertilitas dan perkembangan embrio tahap pre implantasi karena diketahui growth factor ini mempunyai pengaruh mitogenik dan juga merangsang mRNA dan sintesis protein (Leese, 1995 ; Tesarik, 1993)

Menurut Yang and Roy (2001) dan Hendriksen *et al* (2000) oosit yang berasal dari folikel dominan menghasilkan angka fertilitas yang cukup tinggi yaitu sekitar 65 % dibandingkan oosit yang dikoleksi dari folikel ukuran kecil yaitu sekitar 44 %.

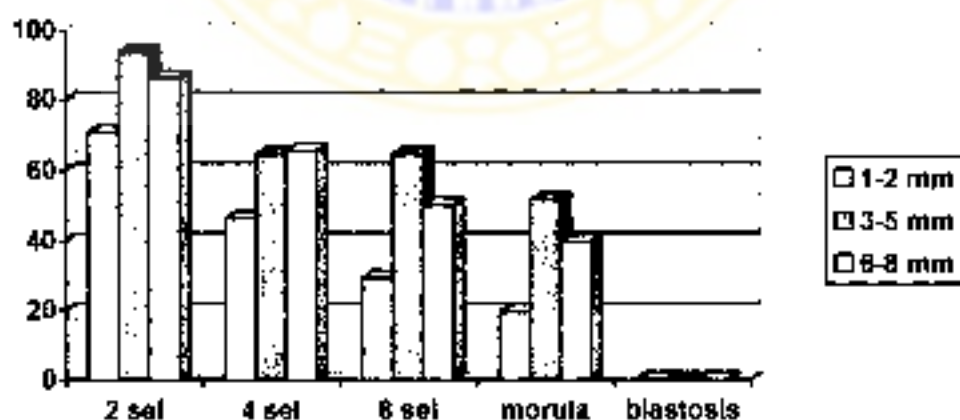
5.3. Viabilitas Embrio Sapi

Data angka viabilitas embrio sapi dari masing-masing perlakuan setelah sigot yang diperoleh dari hasil fertilisasi *in vitro* dilakukan kultur *in vitro* dapat dilihat pada tabel dibawah ini .

Tabel 3. Prosentase angka viabilitas embrio sapi dari masing-masing kelompok perlakuan setelah dilakukan kultur *in vitro*

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah sigot	Pengamatan				
		2 sel	4 sel	8 sel	morula	blastosis
1 - 2 mm	41	29(70,73) ^a	19(46,34) ^a	12(29,27) ^b	8(19,51) ^c	0(0,00) ^d
3 - 5 mm	62	58(93,55) ^b	40(64,52) ^b	40(64,52) ^b	32(51,62) ^b	0(0,00) ^d
6 - 8 mm	58	50(86,21) ^b	38(65,52) ^b	29(50,00) ^c	23(39,66) ^b	0(0,00) ^d

Keterangan: huruf yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 9. Diagram batang angka viabilitas embrio sapi setelah dilakukan kultur secara *in vitro*

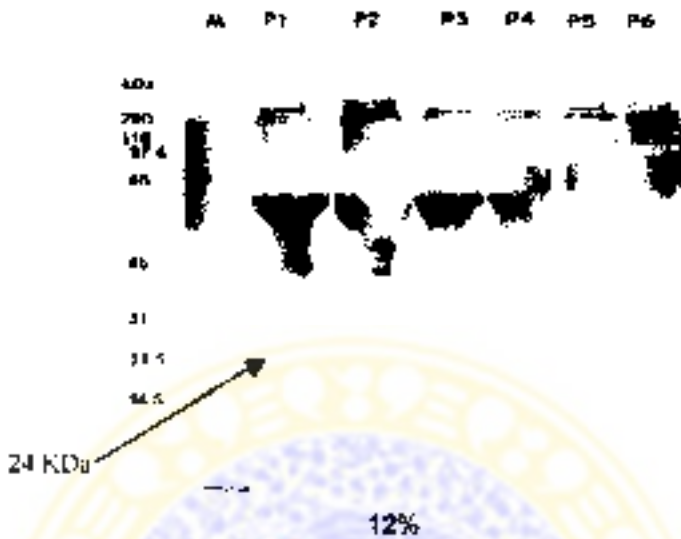
Berdasarkan uji statistik dengan anova diketahui jumlah sigot yang berkembang mencapai tahap 2 sel, 4 sel, 8 sel, dan morula berbeda nyata diantara kelompok perlakuan. Perkembangan sigot dari kelompok diameter permukaan folikel 3 - 5 mm dan 6 - 8 mm pada tahap 2 sel cukup tinggi dibandingkan kelompok 1-2 mm yaitu 93,55 % dan 86,21%. Demikian juga sampai mencapai tahap morula perkembangan kedua kelompok ini masih cukup tinggi, kemudian memasuki tahap blastosis semua kelompok tidak bisa berkembang mencapai tahap blastosis karena adanya gangguan pada inkubator CO₂.

Tingginya jumlah embrio yang berkembang baik pada tahap 2 sel, 4 sel, 8 sel dan morula dari kelompok ukuran permukaan diameter folikel 3-5 mm dan 6-8 mm dibandingkan kelompok 1-2 mm berkaitan dengan proses maturasi oosit. Oosit dari kelompok sedang dan besar mampu melakukan *meiotic competence* sehingga sintesa protein berjalan dengan optimal dan kondisi ini berpengaruh pada proses berikutnya yaitu fertilisasi dan kultur embrio.

Transforming growth factor β berperan penting pada perkembangan embrio tahap preimplantasi. Gangguan sintesa protein *transforming growth factor β* juga dapat menyebabkan pada tingkat kerusakan sehingga embrio mengalami kematian ataupun bila bisa bertahan hidup akan menyebabkan cacat arnangan ekstra embrionik. Hal ini menunjukkan kelangsung hidup embrio tahap preimplantasi juga dipengaruhi oleh peran protein *Transforming growth factor β* (Godkin and Dore, 1998)

5.4. Protein *Transforming Growth Factor* Oosit Sapi

Hasil SDS-PAGE Protein dari oosit sapi



Gambar 10. Protein *Transforming Growth Factor* β dengan berat molekul 24 KDa pada oosit sapi

Persamaan regresi yang dihasilkan dari analisis statistik dan marker protein untuk menentukan berat molekul protein *Transforming Growth Factor* β adalah sebagai berikut :

$$Y = 167,945 - 207,836 X$$

Berdasarkan persamaan tersebut diketahui berat molekul dari protein *Transforming Growth Factor* β adalah 24 KDa.

Dari gambaran hasil analisis dengan metode Sodium dodecyl sulphonat poly acrlamid gel elektroforesis (SDS Page) diketahui bahwa profil Protein *Transforming Growth Factor* β terlihat jelas pada kelompok oosit yang telah mengalami proses maturasi meskipun pada kelompok oosit dari folikel besar yang belum mengalami maturasi sudah mulai tampak sekresi *Transforming*

Growth Factor β . Kemungkinan oosit dari kelompok folikel besar ada beberapa yang terbawa dominan folikel

Kontrol metabolisme dari saat fertilisasi sampai perkembangan embrio pra implantasi berada pada dua tingkat yaitu kontrol intrinsik dikarenakan adanya jumlah dan aktivitas enzim, mediator intrasel dan sistem transfer membran plasma serta kontrol ekstrinsik yang dimediasi melalui lingkungan yang disediakan oleh sistem reproduksi betina. Pada kedua sistem kontrol ini *Transforming Growth Factor* β berperan cukup signifikan hal ini berkaitan dengan sekresi saat proses maturasi. Ukuran folikel yang homogen akan sangat mendukung peran protein ini (Laese, 1995; Duran, 2000)

Kontrol metabolisme intrinsik paling jelas diketahui saat pergantian metabolisme piruvat ke glukosa sebagai sumber energi utama dari saat terjadinya fertilisasi sampai perkembangan awal embrio. Saat pergantian ke kontrol ekstrinsik yaitu ketika terjadi diferensiasi sel terutama perubahan morula ke blastosis sampai tahap implantasi peran *Transforming Growth Factor* β sangat besar menentukan kualitas embrio dan hal ini sangat berhubungan dengan kondisi saat melakukan maturasi oosit. Bila kondisi saat maturasi oosit tidak seragam maka oosit tidak mampu mencapai tingkat kematangan yang optimal maka hasil yang diperoleh juga tidak cukup baik. Sekresi *Transforming Growth Factor* β terjadi saat oosit telah mengalami proses pematangan dan hal ini jelas ditunjukkan dari hasil penelitian yang diperoleh (Roy *et al.*, 1998)

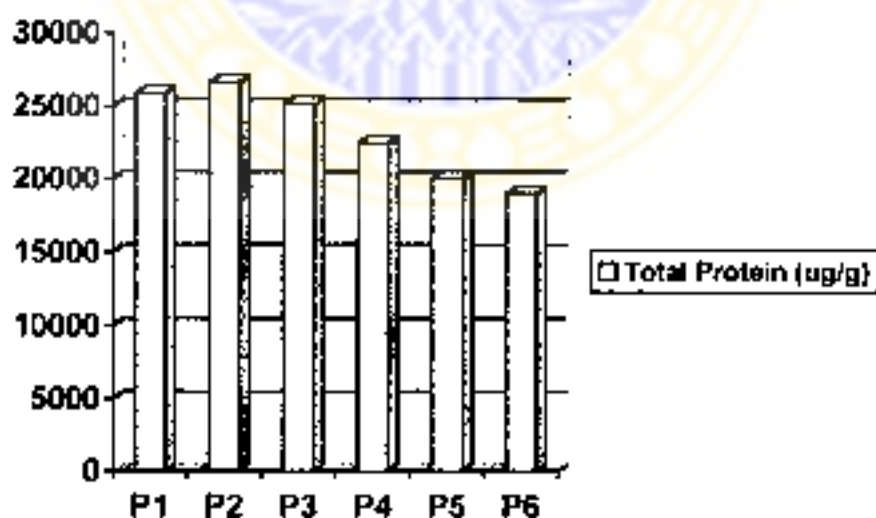
7.5. Total Protein Oosit Sapi

Tabel 4. Nilai rata-rata total protein oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*

Perlakuan	Total Protein µg/g sampel
P1	25857,25
P2	26644,14
P3	25120
P4	22470
P5	20018,57
P6	19004,28

Keterangan :

- P1 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P2 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P3 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P4 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P5 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P6 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*



Gambar 11. Diagram batang total protein pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*

Total protein pada oosit yang sudah mengalami proses maturasi jumlahnya cukup banyak dibandingkan pada oosit yang belum mengalami proses maturasi. Hal ini berkaitan dengan kondisi oosit yang telah mengalami proses maturasi banyak protein yang tersekresi yang tidak dijumpai pada saat oosit belum mengalami maturasi seperti *Transforming Growth Factor β Binding Protein*, *Trophoblast Protein*, *Epidermal growth Factor* dan lain-lain sehingga ketika dilakukan pengukuran kadar total protein akan terlihat perbedaannya. Dengan mengetahui total protein sebelum dan sesudah proses maturasi merupakan data pendukung untuk menentukan kadar protein *Transforming Growth Factor β* yang terdapat pada oosit sapi karena setiap spesies hewan kadarnya berbeda-beda (Ahdon, 2000; Thompson *et al.*, 2003)

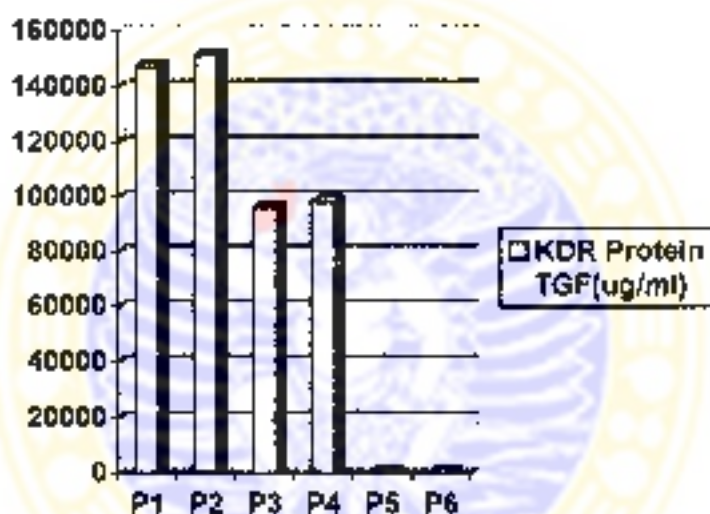
7.6. Kadar Protein *Transforming Growth Factor* Pada Oosit Sapi

Tabel 5. Konsentrasi kadar protein *Transforming Growth Factor β* yang terdapat pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*

Perlakuan	Konsentrasi kadar protein <i>Transforming Growth Factor β</i> ($\mu\text{g/ml}$)
P1	147127,75
P2	151339,51
P3	95958,40
P4	98193,90
P5	0
P6	0

Keterangan :

- P1 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P2 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P3 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P4 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P5 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P6 : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*



Gambar 12. Kadar protein *Transforming Growth Factor* β pada oosit sapi sebelum dan sesudah maturasi *in vitro*

Kadar protein *Transforming Growth Factor* β setelah dilakukan pengujian konsentrasinya tertinggi terdapat pada oosit dari kelompok ukuran sedang dan besar yang telah mengalami proses maturasi. Kadarnya menurun sinergis dengan penurunan ukuran folikel. Dari hasil penelitian ini kadar protein *Transforming Growth Factor* β mempengaruhi tingkat kematangan oosit dan angka fertilitas.

Kadar protein *Transforming Growth Factor* β tertinggi pada kelompok besar dan sedang menghasilkan kualitas oosit yang lebih baik dibanding dengan kelompok kecil, demikian juga angka fertilitas dari kelompok ukura 3-5 mm dan 6-8 mm menghasilkan angka fertilitas cukup tinggi dibanding kelompok 1-2 mm.

Kadar protein *Transforming Growth Factor* β mempengaruhi oosit melakukan meotic competence secara optimal sehingga akan berpengaruh juga pada terjadinya fertilisasi dan perkembangan embrio selanjutnya (Wu *et al.*, 2001). *Transforming Growth Factor* β diketahui meregulasi banyak proses seluler melalui kerja stimulasinya pada pembentukan matriks ekstraseluler, reseptor-reseptor pengikatan matriks seluler dan meningkatkan sintesis protease inhibitor dan ikut berperan terjadinya kondisi cairan dalam uterus. Meningkatnya produksi *Transforming Growth Factor* β mengindikasikan suatu peran dalam mengendalikan proliferasi sel, meningkatkan differensiasi sel (Tang *et al.*, 1994, Godkin and Dore, 1998)

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

1. Tingkat kematangan oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm mencapai angka maturasi lebih tinggi dibandingkan ukuran 3-5 mm dan 1-2 mm yaitu sekitar 100 %
2. Angka fertilitas oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan 6-8 mm adalah sama tinggi dibandingkan oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm
3. Jumlah embrio yang berkembang mencapai tahap morula dari kelompok oosit yang dikoleksi ukuran 3-5 mm dan 6-8 mm tidak berbeda nyata yaitu 51,66 % dan 39,66 %
4. Profil protein *Transforming Growth Factor β* terlihat jelas pada oosit sapi dari semua ukuran folikel yang telah mengalami maturasi dibanding pada oosit yang belum mengalami maturasi
5. Total protein pada oosit sapi yang telah mengalami proses maturasi jumlahnya lebih tinggi dibanding dengan oosit sapi yang belum mengalami proses maturasi dan total protein tertinggi terdapat pada oosu yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan 3-5 mm dan telah mengalami proses maturasi

6. Konsentrasi kadar protein *Transforming Growth Factor* lebih banyak pada oosit yang dikoleksi dari folikel dengan diameter permukaan 3-5 mm dan 6-8 mm dan telah mengalami maturasi

6.2. Saran

Saran yang bisa disampaikan dari penelitian ini adalah :

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

DAFTAR PUSTAKA



- Abdon A.S.S. 2001. Factor affecting *in vitro* of bovine embryos. J. Anim. Reprod. Sci p 1-19.
- Bieser B., M. Stojkovic, E. Wolf, H.Meyer and R. Einspanier. 1998 Growth factor and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. J Biol.Reprod 59(4) 801-809
- Breveni T.A.L., P.Cillo, L.A. Favetta and M Motta. 1998. Somatostatin and the phosphorylation of the epidermal growth factor/transforming growth factor α (TGF α) receptor in LNCaP cells : interactions with a locally produced TGF α . J.Endoc Relat Chem 5 231 - 237
- Boediono, A, Suzuki, L. Y. li and R.A. Godke. 1999. Offspring Born From Chimeras Reconstructed From Parthenogenetic Bovine Embryos. J Reprod. Fertil. Dev. 7: 1073-1079.
- Crozet N., M. Dahirrell and E. Call. 2000. Meiotic competence of *in vitro* grown oocytes. J. Reprod and Fertil. 118 : 367 - 373
- Duran D.H. 1998. Technical aspect of *in vitro* embryo production J Anim Reprod. P : 1- 8
- Gilbert, S.F. 1988. Development Biology. 2nd Sinaeur Associates Inc. Sunderland Massachusetts.
- Godkin J.D and J.L.E. Dore. 1998. Transforming growth factor β and the endometrium. J. Reprod. and Fertil 3 : 1 - 6
- Goers.J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manual. Academic Press USA Pp : 86, 174.
- Hagemann, L.I., S.F. Beaumont, M. Berg, M.J. Donnison, A. Ledgard, A. Peterson, A Schurman and H.R Donnison. 1992. Development during of bovine oocytes from dissected follicle, interactive effects of dissected cycle stage, follicle size and atresia. J. Reprod. Dev. (53) : 451 - 458.
- Hafez E.S.E. 1987. Reproduction in Farm Animal. Lea and Febiger Philadelphia.
- Hendriksen P.J.M., A.M.Vos, W.N.M.Steenweg, M.M. Bevers and S.J.Dielman. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes J. Theriogenology 53 : 11 - 20

- Hyttel, P., I. Fair, H. Callsen and I. Greve. 1997. Oocytes growth, capacitation and final maturation in cattle. *J. Theriogenology* 47: 23-32.
- Kim D. H., H. G Korg, S. W. Han, H. K Kim, D. S Ko, H. J Lee and K. S Churg. 2000. Developmental capacity of mouse oocytes derived from *in vitro* and *in vivo* grown preantnal follicles. In Proceedings Of The Annual Conference International Embryo Transfer Society Maastricht, The Netherlads
- Leese H.J. 1995. Metabolic control during preimplantation mamalian development. *J. Human Reprod.* 1 (1): 63-72.
- Mousa A.A. 2002. *In vitro* maturation of oocytes. A Review article. Alazhar school of Medicine.
- Monk, M. 1987. Mamalian Development a Practical Approach. IRL Press Whasington.
- Osterlund C. and G Fried. 2000. TGF β receptor 1 and II and the substrate protein smad 2 and 3 are present in human oocyte. *J. Mol.Hum. Reprod.* 6(6) : 498 - 503.
- Pawsh, C.H., A. Palanisamy, M. Tanju, S.K. Jain and S.M. Totey. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of Good oocytes and their early embryonic development and cell number. *J. Theriogenology*. 46: 971-982.
- Rieger D. and N.M. Laskutoff. 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocyte. *J. Reprod. And Fertil* 100 : 257 - 262
- Roy S.K , S.G Kurz, A.M Carlson, C.J. De Jonge, J.W Ramey and V.M. Maclin. 1998. Transforming growth factor β receptor in hyperstimulated human granulosa cells and cleavage potential of the zygotes 59 : 1311 - 1316
- Pavokief A. A.Lucas, Hahn, and H.Niemann. 1992. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived form different categories of antral follicles. *J. Mol. Reprod. Dev.* 31 : 63 - 67
- Shamsudin, M., B. Larssan, H. Gustafsson and H. Rodrigues-Martines. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *J. Theriogenology* 39 : 1067-1079.
- Scope R.K. 1987. Protein Purification : Priciples and practice 2nd Ed. Springer Verlag, New York.

- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1991. *Prinsip dan prosedur Statistika*. PT. Gramedia. Jakarta.
- Tang Y.M., Y.Zhao, M.J. Rossi, R.S.Abu-Rustum, G.A. Ksander and N.Chegini. 1994. Expression of transforming growth factor β isoform and TGF type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF β on endometrial stromal cell growth and protein degradation *in vitro*. *J.Endocr.* 135 : 450 – 459.
- Terasik J. 1993. Metabolism of human preimplantation embryos. In Edward R.G., *Preconception and implantation diagnosis of human genetic disease*. Cambridge University Press. P: 43 – 79.
- Tomaszewka, M.W., I.K. Utama, I.G. Putu dan T.D.Chaniago. 1991. *Reproduksi, Trngkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Van Blerkom, J., H. Bell and D. Weipz. 1990. Cellular And Developmental Biological Aspects Of Bovine Meotic Maturation, Fertilization, And Preimplantation Embryogenesis *In vitro*. *J. Electron Microsc Technique* 16: 298-323
- Widjiati dan Rimayanti. 2001. Seleksi Ukuran Folikel terhadap profil transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi *in vitro*. *Media Kedokteran Hewan* (18) : 79-85.
- Widjiati dan Rimayanti. 2002. Seleksi folikel terhadap profil Transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi *in vitro*. *Media Kedokteran Hewan*.
- Wu J., B.R. Emery and D.T. Carrell. 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilisation and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *J.Biol. of Reprod.* 64 : 375 -- 381.
- Yang P and S.K. Roy. 2001. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro*. *J Biol. Reprod.* 65 : 847 - 854

- Hyttel, P., I. Fair, H. Callsen and J. Grove. 1997. Oocytes growth, capacitation and final maturation in cattle. *J. Theriogenology*. 47: 23-32.
- Kim D H., H. G Korg, S. W. Han, H. K Kim, D. S Ko, H. J Lee and K. S Churg. 2000. Developmental capacity of mouse oocytes derived from *in vitro* and *in vivo* grown preantral follicles. In Proceedings Of The Annual Conference International Embryo Transfer Society Maastricht, The Netherlands
- Leese. H.J. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *J. Human Reprod.* 1 (1) . 63-72.
- Mousa A.A 2002. *In vitro* maturation of oocytes. A Review article. Alazhar school of Medicine.
- Monk. M. 1987. Mammalian Development a Practical Approach. IRL Press. Whasington.
- Osterlund C. and G Fried. 2000. TGF β receptor I and II and the substrate protein smad 2 and 3 are present in human oocyte. *J. Mol.Hum. Reprod.* 6(6): 498 – 503.
- Pawshie, C.H., A Palanisamy, M. Taniju, S.K Jain and S.M. Totey 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of Good oocytes and their early embryonic development and cell number. *J. Theriogenology*. 46: 971-982.
- Rieger D and N.M. Laskutoff. 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocyte. *J. Reprod. And Fertil.* 100 : 257 – 262.
- Roy S.K., S.G Kurz, A.M Carlson, C.J DeJonge, J.W. Ramey and V.M. Maclin. 1998. Transforming growth factor β receptor in hyperstimulated human granulosa cells and cleavage potential of the zygotes 59 : 1311 – 1316.
- Pavokicf A, A.Lucas, Hahn. and H.Niemann. 1992. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *J. Mol. Reprod. Dev* 31 : 63 – 67.
- Shamsudin, M., B. Larsson, H. Gustafsson and H. Rodrigues-Martines. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *J. Theriogenology*. 39 : 1067-1079.
- Scope R.K. 1987. Protein Purification : Principles and practice. 2nd Ed. Springer Verlag, New York.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara kerja pengukuran total protein oosit sapi

Penentuan Kadar Protein Oosit Sapi

Penentuan panjang gelombang maksimum. 1000 μ l. larutan standar BSA dengan konsentrasi 5000 ppm, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang antara 500 sampai 600 nm.

Pembuatan kurva standar BSA. Dstiapkan 9 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan 200 μ l. larutan standar BSA dengan konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ppm ditambah 800 μ l. reagen biuret kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya diukur serapannya pada a panjang gelombang gelombang maksimum. Kemudian dibuat regresi linier sehingga diperoleh kurva standar BSA.

Penentuan kadar protein. Kadar protein ditentukan dengan cara 200 μ l. oosit dalam medium walet ditambah 800 μ l. reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian diukur serapannya pada 560 nm. Sebagai blanko digunakan 200 μ l. akuades ditambah 800 μ l reagen biuret, dikocok, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang dan diukur serapannya. Konsentrasi protein dibaca langsung konsentrasinya pada alat spektrofotometer atau ditentukan dari perhitungan dengan persamaan regresi linier BSA, atau di hitung dengan rumus :

$$Y = aX \quad , \quad X = \frac{Y}{a} \quad \text{di mana } X = \text{konsentrasi total protein}$$

Lampiran 2. Cara kerja SDS PAGE

Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE 12 %

4. Siapkan semua bahan yang diperlukan

- Acrilamid,- Tris HCL pH 8,8,- Tris HCL pH 6,8,- SDS 0,5 %,- Aquadest,- Temet,- APS 10 %, 4 °C,- E Buffer,- Methanol 50 %,- Acetic Acid / Asam Asetat 7,5 %,- Glutaral Dehid 10 %,- NaOH 0,36 %,- NH₃ ,- AgNO₃ , Formaldehyde,- Zitronensoure 5 %, Butanol.

2. Membuat running gel.

Bahan:

- Acrilamid 2,5 ml,- Tris HCL pH 8.8 1,2 ml,- SDS 0,5 % 1,2 ml, Aquadest 1,1 ml,- Temet 5,0 ul,- APS 10 % 30 ml.

3. Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas.

4. Tambahkan butanol di atasnya sampai penuh. Fungsi dari butanol adalah meratakan permukaan running gel.

5. Membuatstacking gel.

Bahan :

- Acrilamid 0,66ml,- Tris HCL pH 6.8 0,8ml,- SDS 0,5 % 0,8ml,- Aquadest 0,8ml,- Temet 4,0 ul, - APS 10 % 20 ul (Fungsunya untuk mengumpulkan)

6. Masukkan keatas cetakan running gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit

8. Siapkan sample (Laemi buffer + sample) masukkan kedalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum setengh tusukan, langsung godak

dengan 100 °C selama 5 menit

9. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1 kali.
10. Masukkan cetakan tadi ke Bio Rad.
11. Tuangi dengan E buffer 1 kali (kira kira 800 ml)
12. Masukkan sample ke dalam lubang comb tadi dan hilangkan gelembung tadi dengan jarum.
13. Pasang listrik dengan 125 V dan 40 V mA.
14. Tunggu sampai sample turun seluruhnya.
15. Matikan listrik dan lepas agar - agar pelan - pelan.
16. Masukkan ke petridish yang sudah ada larutan pencucian.
17. Tahap pencucian.

Pencucian I :

- Methanol 25 ml,- Asam asetat 3,75 ml,- Aquuadest 72,25 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit.

Pencucian II :

Methanol 2,5 ml,- Asam asetat 3,75 ml,- Aquadest 93, 75 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit.

Pencucian III: Glutaraldehyd 10 % 30 menit

- Glutaraldehyd 10 ml, - Aqudest 90 ml,

Pencucian IV

- Pencucian dengan aquadest @ 100 ml 3 kali selama 30 menit.

17. Tahap pewarnaan :

Timbang AgNO_3 0.8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan kedalam

larutan yang terdiri dari :

- NaOH 0,36 % 21 ml, - NH₃ 1,4 ml Aquadest 73,5 ml.

Masukkan kedalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit

18. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit.

19. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

- Formaldehyd 3,7 % 50 μ l, - Zitronensaure 5 % 100 μ l, - Aquadest 100 ml

Tunggu 5 menit sambil goyang terus.

20. Masukkan reaksi dengan acetic acid.

21. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit.

22. Beri glicerol 10 %

- Glicerol 10 ml.
- Aquadest 90 ml.

Penentuan berat molekul. Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai *RF* (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

$$RF = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga *Rf* sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y . Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

Lampiran 3. Cara kerja pewarnaan aceto orcein 1%**PEWARNAAN ACETO ORCEIN**

(Untuk pewarnaan Pronukleus setelah 18 - 20 jam)

Media pewarna . Aceto 1%

Orcenin	1.0 Gr
Acetic acid	45.0 ml.

Cara kerja :

1. Panaskan Acetic Acid (dalam baker glass) dengan bunsen selama 20 detik; dan tambahkan Orcenin.
2. Campur hingga merata dan segera angkat dari api, taruh pada suhu Kamar.
3. Setelah dingin (= suhu kamar) tambahkan 55 ml distilled Water (DW)
4. Filtrasi.
5. Taruh dalam botol gelap dan tutup rapat. Simpan ditempat yang gelap (bisa digunakan selama 6 bulan).

MEDIA PENGHILANG WARNA : Aceto Glycerol

- | | |
|----------------|--------|
| 1. Acetic acid | 20 ml. |
| 2. Glycerin | 20 ml. |
| 3. DW | 60 ml. |
4. Campur hingga merata dan simpan dalam botol gelap tertutup rapat, simpan ditempat yang gelap.

MEDIA FIKSASI

- | | |
|-------------------|------------|
| 1. Acetic acid | 1.0 Bagian |
| 2. Etanol absolut | 3.0 Bagian |

Simpan dalam suhu kamar dalam botol tertutup rapat (dalam ruang gelap).

PROSEDUR PEWARNAAN

1. Setelah difikasi selama 3- 4 hari, ambil gelas objek perlahan-lahan
2. Teteskan media pewarna (Aceto Orcein) pada salah satu sisi gelas penutup dengan menggunakan potongan kertas filter, sehingga media pewarna mewarnai oosit
3. Diamkan pewarnaan selama 2 sampai 3 menit : tekan lagi perlahan-lahan bila oosit tidak terfikasi dengan baik (bergerak)
4. Dengan cara yang sama, gantikan media pewarna dengan media penghilang warna (Accto glyccrol) sampai semua warna tertusap.
5. Fikasi ujung gelas penutup dengan cutex bening
6. Amati di bawah mikroskop.



Lampiran 4. Data total protein oosit sapi sesudah dan sebelum maturasi *in vitro*

Kadar Total Protein Oosit Sapi Sebelum Dan Sesudah Maturasi *In Vitro*

No	Sampel	Total Protein μg sampel
1	P1	16500,8
2	P2	13940
3	P3	12630
4	P4	13740
5	P5	12790
6	P6	11230
7	P1	16780
8	P2	14210
9	P3	13520
10	P4	12680
11	P5	12010
12	P6	11200
13	P1	17080
14	P2	14960
15	P3	13890
16	P4	13190
17	P5	12430
18	P6	11600
19	P1	41900
20	P2	39200
21	P3	35800
22	P4	35560
23	P5	24560
24	P6	23060

25	P1	33860
26	P2	32900
27	P3	32040
28	P4	26080
29	P5	24380
30	P6	23540
31	P1	20080
32	P2	37400
33	P3	35100
34	P4	31440
35	P5	30160
36	P6	30200
37	P1	34800
38	P2	33900
39	P3	32860
40	P4	24600
41	P5	23800
42	P6	22200

Keterangan :

- P1** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P2** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P3** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan telah dilakukan maturasi *in vitro*
- P4** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 6-8 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P5** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 3-5 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*
- P6** : Oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm dan belum dilakukan maturasi *in vitro*

Lampiran 5. Data tingkat kematangan oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan maturasi *in vitro*

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah oosit	Tingkat kematangan oosit			
		GV	GVBD	MI	MII
1-2 mm	116	25	64	27	-
3-5 mm	84	-	18	-	66
6-8 mm	50	-	-	-	50

Keterangan :

- GV : Germinal vesicle
 GVBD : Germinal vesicle Break Down
 MI : Metafase I
 MII : Metafase II

Lampiran 6. Data angka fertilitas oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter permukaan 1-2 mm, 3-5 mm dan 6-8 mm setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah oosit	Pengamatan	
		Terjadi fertilisasi	Tidak terjadi fertilisasi
1-2 mm	162	41	121
3-5 mm	66	62	4
6-8 mm	68	58	10



Lampiran 7. Data jumlah perkembangan embrio sapi setelah dilakukan kultur *in vitro*

Ukuran diameter permukaan folikel	Jumlah sigot	Pengamatan				
		2 sel	4 sel	8 sel	morula	hlastosis
1 – 2 mm	41	29	19	12	8	0
3 – 5 mm	62	58	40	40	32	0
6 – 8 mm	58	50	38	29	26	0



Lampiran 8. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap *germinal vesicle*

Summarize

Case Summaries^a

			Jumlah oosit	CV	Persentase CV	Transf. Vs +0,5
Diameter kecil	1		30	8	26,667	5,2
	2		32	7	21,875	4,7
	3		34	8	23,529	4,8
	4		20	0	0,000	7,0
	Total	Sum	116	23	72,071	15,5
	Mean	29,00	5,75	18,01777	3,88	
	Std. Deviation	6,218	3,862	12,175169	2,129	
Sedang	1		24	0	0,000	7,0
	2		20	0	0,000	7,0
	3		12	0	0,000	7,0
	4		28	0	0,000	7,0
	Total	Sum	84	0	0,000	2,8
	Mean	21,00	0,00	0,00000	7,00	
	Std. Deviation	6,831	0,000	0,000000	0,000	
Besar	1		15	0	0,000	7,0
	2		10	0	0,000	7,0
	3		12	0	0,000	7,0
	4		13	0	0,000	7,0
	Total	Sum	50	0	0,000	2,8
	Mean	12,50	0,00	0,00000	7,00	
	Std. Deviation	2,082	0,000	0,000000	0,000	
Total	Sum	250	23	72,071	21,3	
	Mean	20,83	1,92	6,00592	1,76	
	Std. Deviation	8,601	3,476	10,914572	1,924	

a. Limited to first 100 cases

Oneway

ANOVA

Transformasi Vy+0,5 (GV)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.979	2	13.490	8.921	.007
Within Groups	13.609	9	1.512		
Total	40.588	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Transformasi Vy+0,5 (GV)

Duncan^a

Diameter folikel	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Sedang	4	70711	
Besar	4	70711	
Kecil	4		3.82787
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

* Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000

Lampiran 9. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapt tahap *germinal vesicle* break down

Summarize

Case Summaries^a

			Jumlah oosit	GVB/D	Persentase GVB/D	Transfo Vs=0,3 (0
Diameter folikel	Kecil	1	30	14	46.667	6.80
		2	32	20	62.500	7.93
		3	34	17	50.000	7.10
		4	29	16	80.000	8.97
	Total	Sum	116	67	237.167	30.8
		Mean	29.00	16.75	59.79167	7.720
		Std. Deviation	6.218	2.500	15.098059	9518
Sedang	1	1	24	4	16.667	4.34
		2	20	6	30.000	5.52
		3	12	2	16.667	4.74
		4	28	6	21.429	4.68
	Total	Sum	84	18	84.762	18.4
		Mean	21.00	4.50	21.19048	4.62
		Std. Deviation	6.831	1.915	6.287398	.6514
Besar	1	1	15	0	.000	.70
		2	10	0	.000	.70
		3	12	0	.000	.70
		4	13	0	.000	.70
	Total	Sum	50	0	.000	2.82
		Mean	12.50	.00	.00000	.707
		Std. Deviation	2.082	.000	.000000	.0008
Total	Sum		250	85	323.929	52.2
	Mean		20.83	7.08	26.994405	4.350
	Std. Deviation		8.601	7.573	27.227365	3.057

^a Limited to first 100 cases

Oneway**ANOVA**

Transformasi Vy-0,5 (GVBD)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	98,832	2	49,416	111,430	,000
Within Groups	3,991	9	,443		
Total	102,824	11			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets**

Transformasi Vy+0,5 (GVBD)

Duncan^a

Diameter kirkel	N	Subset for alpha = ,05		
		1	2	3
Besar	4	7,0711		
Sedang	4		4,62309	
Kecil	4			7,72189
Sig		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000

Lampiran 10. Analisis statistik tingkat kematangan oosit sapi tahap metafase I

Summarize

Case Summaries^a

			Jumlah oosit	Metafase I	Persentase metafase I	Transformasi
Diameter folikel	Kecil	1	30	8	26.667	5.21
		2	32	6	18.750	4.38
		3	34	9	26.471	5.19
		4	20	4	20.000	4.52
		Total	Sum	116	27	91.887
	Mean	29.00	6.75	22.97181	4.830	
	Std. Deviation	6.218	2.217	4.185242	43.40	
Sedang		1	24	0	0.00	.70
		2	20	0	0.00	.70
		3	12	0	0.00	.70
		4	28	0	0.00	.70
		Total	Sum	84	0	0.00
	Mean	21.00	0.00	0.00000	.707	
	Std. Deviation	6.431	0.00	0.00000	0.000	
Desar		1	15	0	0.00	.70
		2	11	0	0.00	.70
		3	12	0	0.00	.70
		4	13	0	0.00	.70
		Total	Sum	50	0	0.00
	Mean	12.50	0.00	0.00000	.707	
	Std. Deviation	2.082	0.00	0.00000	0.000	
Total	Sum		250	27	91.887	24.9
		Mean	20.83	2.25	7.65727	2.081
		Std. Deviation	8.601	3.519	11.519785	2.042

^a Limited to first 100 cases.

One-way**ANOVA**

Transformasi Vy -0,5 (Meta 1)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45,332	2	22,666	369,885	,000
Within Groups	965	9	106,4		
Total	45,898	11			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets**

Transformasi Vy+0,5 (Meta 1)

Duncan^a

Parameter folikel	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Sedang	4	.70711	
Besar	4	.70711	
Kecil	4		4,83017
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000

Lampiran 11. Analisis statistik tingkat kematangan positif sapi tabap metafase II

Summarize

Case Summaries^a

			Jumlah positif	Metafase II	Persentase metafase II	Transformasi (%)	
Diameter Kecil	Kecil	1	30	0	0,00	70,71	
		2	32	0	0,00	70,71	
		3	34	0	0,00	70,71	
		4	20	0	0,00	70,71	
	Total		Sum	116	0	0,00	2,82
			Mean	29,00	0,00	0,00000	70,71
			Std. Deviation	6,218	0,00	0,00000	0,0000
	Sedang	1	24	20	83,333	9,15	
		2	20	14	70,000	8,39	
		3	12	10	83,333	9,15	
4		28	22	78,571	8,89		
Total		Sum	84	66	315,238	35,60	
		Mean	21,00	16,50	78,50952	8,900	
		Std. Deviation	6,831	5,508	6,287398	3,581	
Besar	1	15	15	100,000	10,62		
	2	10	10	100,000	10,62		
	3	12	12	100,000	10,62		
	4	13	13	100,000	10,62		
	Total		Sum	50	50	400,000	40,10
			Mean	12,50	12,50	100,00000	10,62
		Std. Deviation	2,082	2,082	0,00000	0,0000	
Total		Sum	250	116	315,238	78,52	
		Mean	20,83	9,67	59,60317	6,544	
		Std. Deviation	8,601	7,958	45,057435	4,3415	

a. Limited to first 100 cases.

Oneway**ANOVA**

Transformasi Vy+0,5 (Meta II)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	206,952	2	103,476	2420,349	,000
Within Groups	385	9	,043		
Total	207,337	11			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets**

Transformasi Vy+0,5 (Meta II)

Duncan^a

Diameter folikel	N	Subset for alpha = 0,05		
		1	2	3
Kecil	4	7,0711		
Sedang	4		8,90019	
Besar	4			10,02497
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

* Laca Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 12. Analisis statistik angka fertilitas oosit sapi**Summarize****Case Summaries^a**

			Jumlah oosit	Jumlah fertisasi	Persentase fertisasi	Transformasi %	
Diameter oosit	Kecil	1	49	7	14.286	3.780	
		2	70	17	24.286	4.928	
		3	19	5	26.316	5.130	
		4	24	12	50.000	7.071	
	Total	N	4	4	4	4	
		Sum	162	41	114.887	29.909	
		Mean	40.50	10.25	28.72180	5.23716	
		SD	23.643	5.377	15.128672	1.365555	
		Sedang	1	17	14	82.353	9.075
			2	27	26	96.296	9.813
3	8		8	100.000	10.000		
4	14		14	100.000	10.000		
Total	N	4	4	4	4		
	Sum	66	62	378.649	38.888		
	Mean	16.50	15.50	94.66241	9.72198		
	SD	7.937	7.550	8.389021	4.40326		
	Besar	1	26	20	76.923	8.771	
		2	17	17	100.000	10.000	
3		12	8	66.667	8.165		
4		13	13	100.000	10.000		
Total	N	4	4	4	4		
	Sum	68	58	343.590	36.936		
	Mean	17.00	14.50	85.89744	9.23389		
	SD	6.377	5.196	16.813945	.918532		
	Total	N	12	12	12	12	
		Sum	296	181	837.126	96.732	
Mean		24.67	13.42	69.76052	8.06111		
SD		17.819	6.047	33.035284	7.383688		

^a Limited to first 100 cases

Oneway

Descriptives

Persentase fertilisasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kecil	4	28.72180	15.128672	7.564336	14.286	50.000
Sedang	4	94.66231	8.389921	4.194961	82.353	100.000
Besar	4	85.89744	16.813945	8.406972	66.667	100.000
Total	12	69.76052	3.1635284	9.536465	14.286	100.000

ANOVA

Persentase fertilisasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10258.704	2	5129.351	26.441	.000
Within Groups	1745.929	9	193.992		
Total	12004.630	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Persentase fertilisasi

Duncan^a

Diameter telur	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kecil	4	28.72180	
Besar	4		85.89744
Sedang	4		94.66231
Sig.		1.000	.397

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ANOVA

TRANSF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	108.850	2	54.425	11.381	.003
Within Groups	43.038	9	4.782		
Total	151.888	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

TRANSF

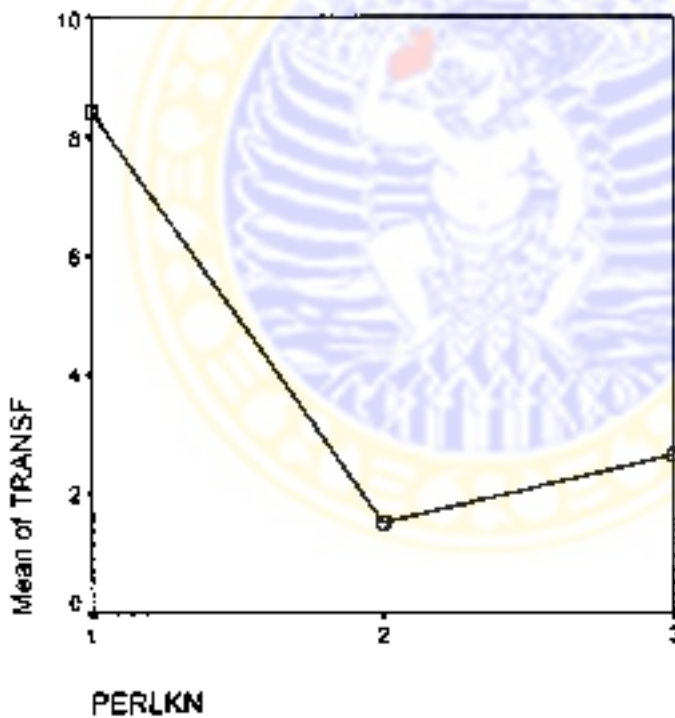
Duncan^a

PERLKN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
2	4	1,5313	
3	4	2,6443	
1	4		8,4037
Sig		.490	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Means Plots



Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
JMLOOS * PERLKN	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
YDKFERT * PERLKN	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PROSENT * PERLKN	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
TRANSF * PERLKN	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			JMLOOS	YDKFERT	PROSENT	TR
PERLKN 1	1		49	42	85,71	
	2		70	53	75,71	
	3		19	14	73,68	
	4		24	12	50,00	
	Total	N	4	4	4	
		Mean	40,50	30,25	71,2782	8
		Sum	162	121	285,11	
		Std. Deviation	23,643	20,435	15,12867	
2	1		17	3	17,65	
	2		27	1	3,70	
	3		8	0	,00	
	4		14	0	,00	
	Total	N	4	4	4	
		Mean	16,50	1,00	5,3377	
		Sum	66	4	21,35	
		Std. Deviation	7,937	1,414	8,38992	1.
3	1		26	6	23,08	
	2		17	0	,00	
	3		12	4	33,33	
	4		13	0	,00	
	Total	N	4	4	4	
		Mean	17,00	2,50	14,1026	2
		Sum	68	10	56,41	
		Std. Deviation	6,377	3,000	16,81394	3.
Total	N		12	12	12	
	Mean		24,67	11,25	30,2395	4
	Sum		296	135	362,87	
	Std. Deviation		17,819	17,726	33,03528	3.

a. Limited to first 100 cases.

neway

Descriptives

Transformasi Vy%

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kecil	4	5,22716	1,36555	,682778	3,780	7,071
Sedang	4	9,72198	,440326	,220163	9,075	10,000
Besar	4	9,23389	,918532	,459266	8,365	10,000
Total	12	8,08104	2,283688	,659244	3,780	10,000

ANOVA

Transformasi Vy%

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48,661	2	24,330	25,149	,000
Within Groups	8,707	9	,967		
Total	57,368	11			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets**

Transformasi Vy%

Duncan^a

Diameter awal	N	Subset for alpha = ,05	
		1	2
Kecil	4	5,22716	
Besar	4		9,23389
Sedang	4		9,72198
Sig.		1,000	,501

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Case Processing Summary^a

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
RL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

d to first 100 cases.

Case Summaries^a

		JMSIG	2seel	PROS	TRANS
1,00	1	10,00	7,00	70,00	,84
	2	10,00	8,00	80,00	,89
	3	13,00	8,00	61,54	,78
	4	8,00	6,00	75,00	,87
	Total N	4	4	4	4
2,00	1	20,00	18,00	90,00	,95
	2	15,00	14,00	93,33	,97
	3	12,00	12,00	100,00	1,00
	4	15,00	14,00	93,33	,97
	Total N	4	4	4	4
3,00	1	10,00	10,00	100,00	1,00
	2	16,00	14,00	87,50	,94
	3	18,00	15,00	83,33	,91
	4	14,00	11,00	78,57	,89
	Total N	4	4	4	4
Total N		12	12	12	12

d to first 100 cases.

Descriptives

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
4	7,2500	,96743	,47871	6,7265	8,7735
4	14,5000	2,51681	1,25831	10,4955	18,5045
4	12,5000	2,38048	1,19024	8,7121	16,2879
12	11,4167	3,70401	1,06926	9,0633	13,7701

Minimum	Maximum
6,00	8,00
12,00	18,00
10,00	15,00
8,00	18,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Groups	112,167	2	56,083	13,028	,002
roups	38,750	9	4,306		
	150,917	11			

oc Tests

ogeneous Subsets

2se1

N	Subset for alpha = .05	
	1	2
4	7,2500	
4		12,5000
4		14,5000
	1,000	,206

groups in homogeneous subsets are displayed.

Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Case Processing Summary^a

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

ed to first 100 cases.

Case Summaries^a

		JM SIG	4 sel	PROS	TRANS
1,00	1	10,00	5,00	50,00	,71
	2	10,00	4,00	40,00	,83
	3	13,00	7,00	53,85	,73
	4	8,00	3,00	37,50	,61
	Total N	4	4	4	4
2,00	1	20,00	13,00	65,00	,81
	2	15,00	10,00	66,67	,82
	3	12,00	8,00	66,67	,82
	4	15,00	9,00	60,00	,77
	Total N	4	4	4	4
3,00	1	10,00	5,00	50,00	,71
	2	16,00	10,00	62,50	,79
	3	18,00	14,00	77,78	,88
	4	14,00	9,00	64,29	,80
	Total N	4	4	4	4
Total N	12	12	12	12	

ed to first 100 cases.

Descriptives

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
4	4,7500	1,70783	,85391	2,0325	7,4675
4	10,0000	2,16025	1,08012	6,5628	13,4374
4	9,5000	3,69685	1,84842	3,6175	15,3825
12	8,0833	3,44088	,99589	5,8914	10,2753

Minimum	Maximum
3,00	7,00
8,00	13,00
5,00	14,00
3,00	14,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Groups	67,167	2	33,583	4,741	,039
roups	63,750	8	7,969		
	130,917	11			

Post Hoc Tests

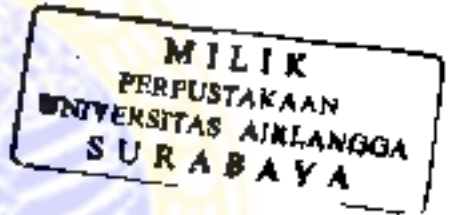
Homogeneous Subsets

4 set

N	Subset for alpha = .05	
	1	2
4	4,7500	
4		9,5000
4		10,0000
	1,000	,796

groups in homogeneous subsets are displayed.

Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Case Processing Summary^a

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
RL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
ERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
PERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

a. Listwise, based on the first 100 cases.

Case Summaries^a

		JMLSIG	6 sel	PROS	TRANS
DO	1	10,00	3,00	30,00	,55
	2	10,00	2,00	20,00	,45
	3	13,00	5,00	38,46	,82
	4	8,00	2,00	25,00	,50
	Total	N	4	4	4
DO	1	20,00	12,00	60,00	,77
	2	15,00	10,00	66,67	,82
	3	12,00	8,00	66,67	,82
	4	15,00	10,00	66,67	,82
	Total	N	4	4	4
DO	1	10,00	5,00	50,00	,71
	2	18,00	7,00	43,75	,56
	3	18,00	8,00	50,00	,71
	4	14,00	8,00	57,14	,76
	Total	N	4	4	4
Total	N	12	12	12	12

a. Listwise, based on the first 100 cases.

Descriptives

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
4	3,0000	1,41421	,70711	,7497	5,2503
4	10,0000	1,63299	,81650	7,4015	12,5985
4	7,2500	1,70783	,85391	4,5325	9,9675
12	6,7500	3,33371	,96236	4,6919	8,8681

Minimum	Maximum
2,00	5,00
6,00	12,00
5,00	9,00
2,00	12,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
groups	99,500	2	49,750	19,881	,001
groups	22,750	9	2,528		
	122,250	11			

Tests**Homogeneous Subsets**

8 sel

N	Subset for alpha = 05		
	1	2	3
4	3,0000		
4		7,2500	
4			10,0000
	1,000	1,000	1,000

groups in homogeneous subsets are displayed.

Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Case Processing Summary^a

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
ERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
ERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%
ERL	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

to first 100 cases.

Case Summaries^a

	JMLSIG	morula	PROS	TRANS
0 1	10,00	1,00	10,00	,32
2	10,00	2,00	20,00	,45
3	13,00	5,00	38,45	,62
4	8,00	,00	,00	,00
Total N	4	4	4	4
0 1	20,00	10,00	50,00	,71
2	15,00	7,00	48,67	,68
3	12,00	6,00	50,00	,71
4	15,00	9,00	60,00	,77
Total N	4	4	4	4
0 1	10,00	3,00	30,00	,55
2	18,00	7,00	43,75	,66
3	18,00	7,00	38,89	,62
4	14,00	6,00	42,86	,65
Total N	4	4	4	4
tal N	12	12	12	12

to first 100 cases.

Descriptives

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
4	2,0000	2,16025	1,08012	-1,4374	5,4374
4	8,0000	1,82574	,91287	5,0948	10,9052
4	5,7500	1,89297	,94648	2,7379	8,7621
12	5,2500	3,13702	,90558	3,2568	7,2432

Minimum	Maximum
,00	5,00
6,00	10,00
3,00	7,00
,00	10,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
groups	73,500	2	36,750	9,518	,006
within groups	34,750	9	3,861		
Total	108,250	11			

Tests

Homogeneous Subsets

LSD

N	Subset for alpha = .05	
	1	2
4	2,0000	
4		5,7500
4		6,0000
	1,000	,140

Means in homogeneous subsets are displayed.

LSD Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 14. Analisis statistik persamaan regresi penentuan berat molekul protein *transforming growth factor*

Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
PERLKUAN	73,92500	62,379043	8
TGF	,45238	,259332	8

Correlations

		PERLK	TGF
Pearson Correlation	PERLKUAN	1,000	-,864
	TGF	-,864	1,000
Sig. (1-tailed)	PERLK		,003
	TGF	,003	
N	PERLK	8	8
	TGF	8	8

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	TGF		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: PERLK

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,864	,747	,704	33,918417

a. Predictors (Constant), TGF

b. Dependent Variable: PERLK

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	20335,261	1	20335,261	17,879	,006
	Residual	6902,754	6	1150,459		
	Total	27238,015	7			

a. Predictors (Constant), TGF

b. Dependent Variable: PERLK

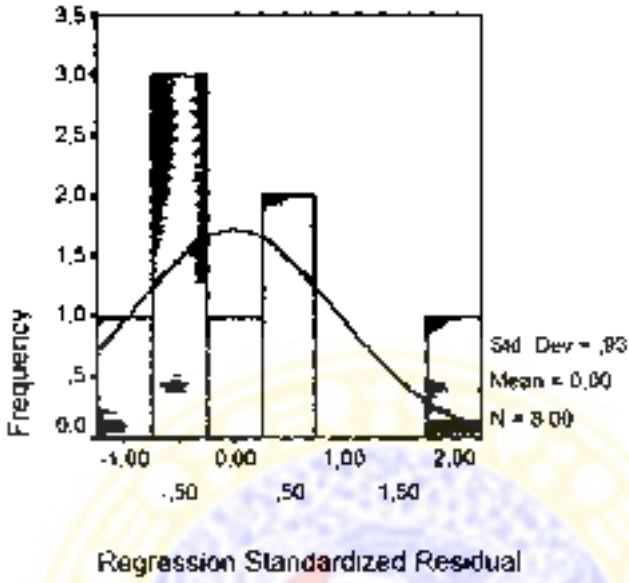
Residuals Statistics

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-3,51985	134,69885	73,92500	63,898398	8
Residual	-35,85295	65,10114	,00000	31,402352	8
Std. Predicted Value	-1,437	1,131	,000	1,000	8
Std. Residual	-1,057	1,919	,000	,926	8

a. Dependent Variable: PERLK

Histogram

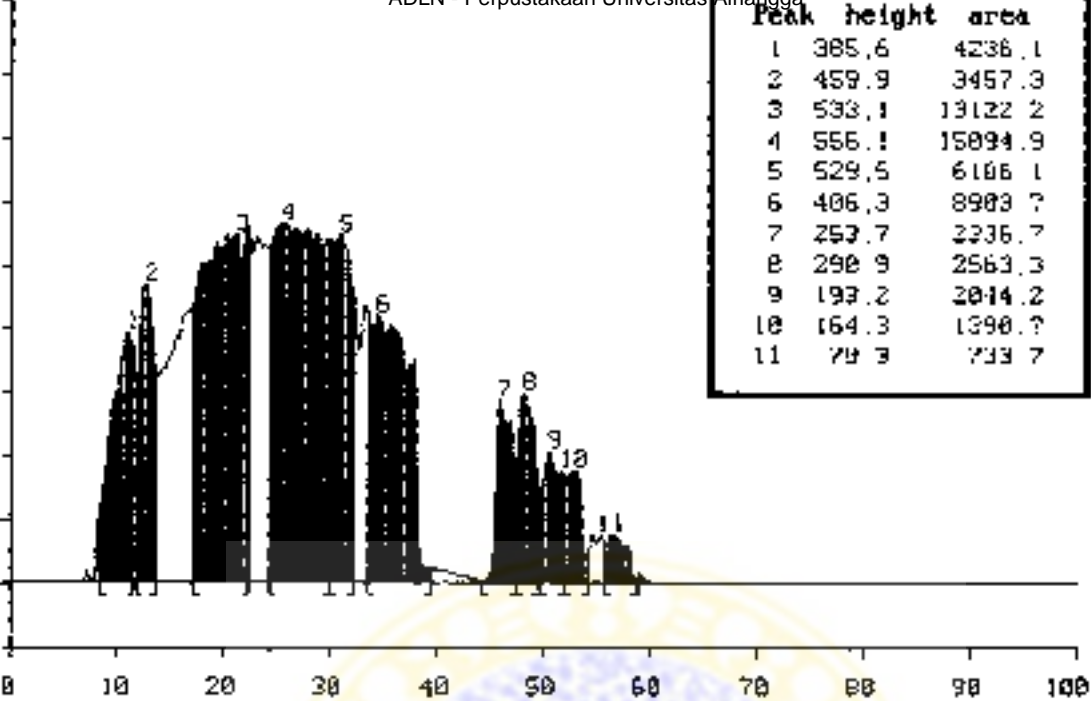
Dependent Variable: PERLK



B₁

Analysis a:

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

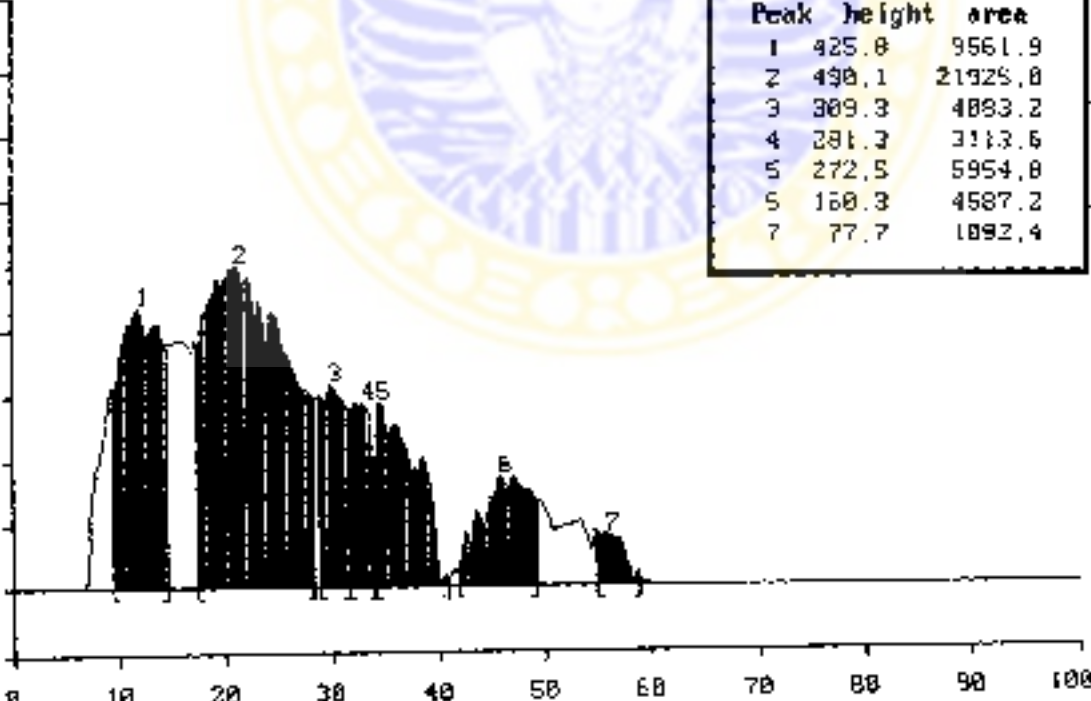


Peak	height	area
1	385.6	4236.1
2	459.9	3457.3
3	533.1	13122.2
4	556.1	15094.9
5	529.5	6106.1
6	406.3	8903.7
7	257.7	2236.7
8	290.9	2563.3
9	197.2	2014.2
10	164.3	1390.7
11	79.3	733.7

th: 573 nm [nm]
 noise level: 1.458AU, raw data file: D1N025
 S/N:8401A001 CAMAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

B₂

Analysis b:

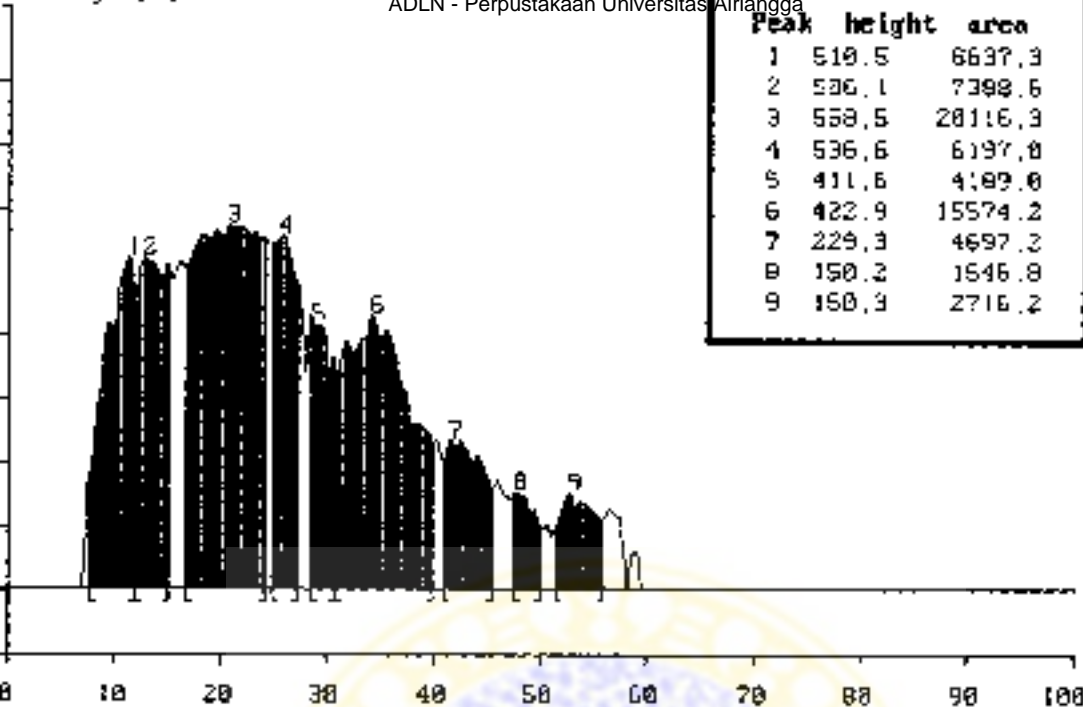


Peak	height	area
1	425.8	9561.9
2	490.1	21925.8
3	309.3	4093.2
4	281.3	3113.6
5	272.5	5954.8
6	160.3	4587.2
7	77.7	1092.4

th: 573 nm [nm]
 noise level: 1.458AU, raw data file: D1N025
 S/N:8401A001 CAMAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

Analysis c:

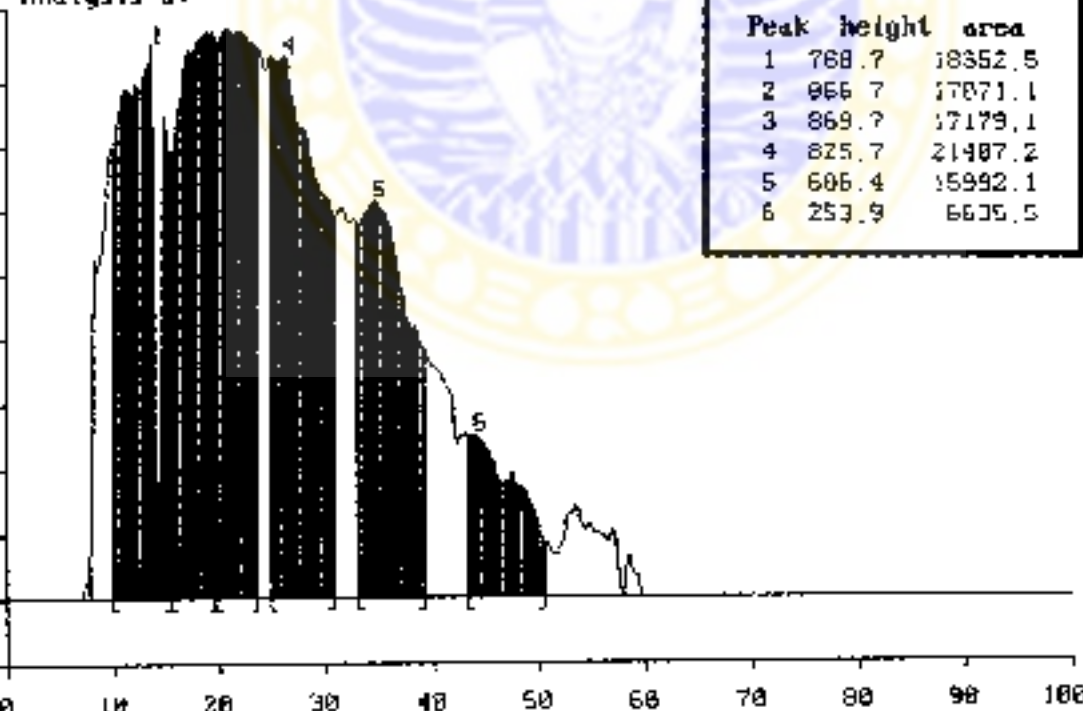
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga



Peak	height	area
1	510.5	6637.3
2	536.1	7398.6
3	558.5	28116.3
4	536.6	6197.0
5	411.6	4189.0
6	422.9	15574.2
7	229.3	4697.2
8	150.2	1546.8
9	150.3	2716.2

Wavelength: 578 nm
 Noise level: 1.450AU, raw data file: D1N025
 Scan: 0401000
 CANAG SOFTWARE (c) 1996
 SCANNER #: 820381

Analysis d:



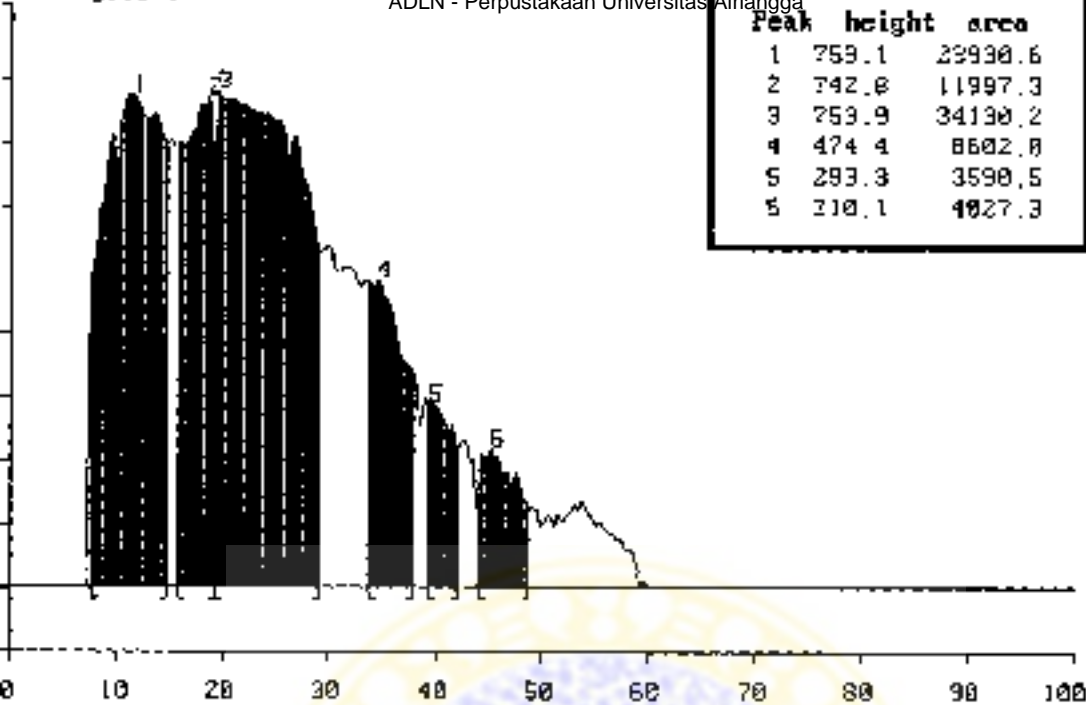
Peak	height	area
1	768.7	18352.5
2	966.7	17871.1
3	869.7	17179.1
4	825.7	21487.2
5	606.4	15992.1
6	253.9	6635.5

Wavelength: 578 nm
 Noise level: 1.450AU, raw data file: D1N025
 Scan: 0401000
 CANAG SOFTWARE (c) 1996
 SCANNER #: 820381

B3

Analysis e:

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

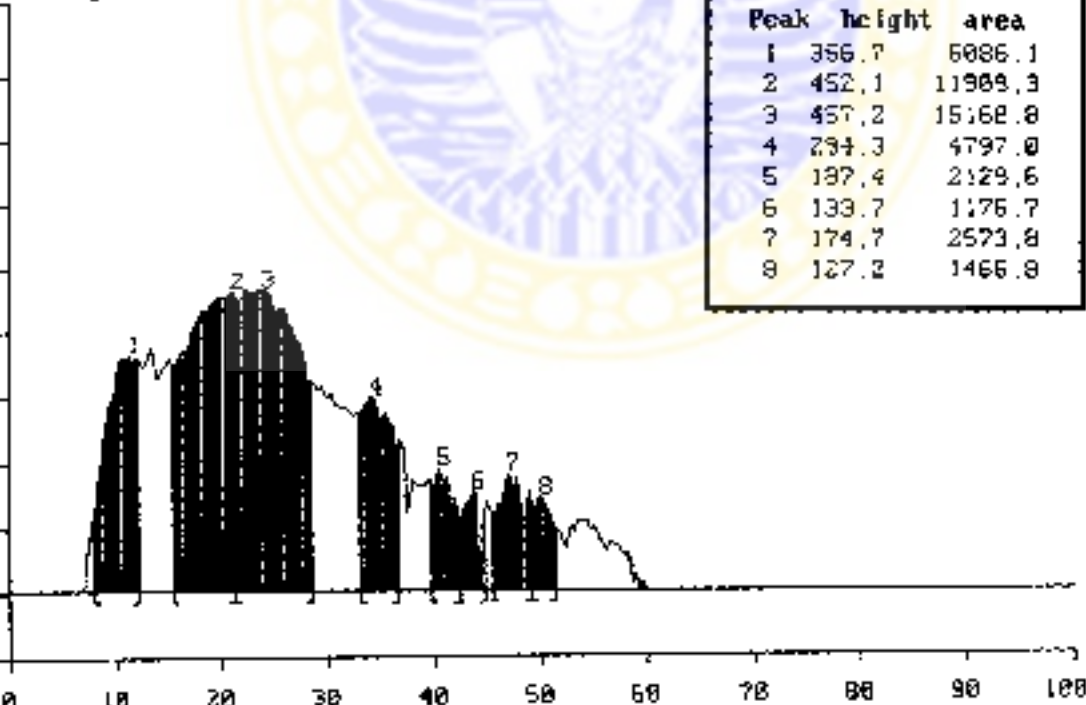


0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 [nm]

Wavelength: 573 nm [nm]
 Noise level: 1.450AU, raw data file: DINO25
 S/N: 04010001 CANAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

B6

Analysis f:



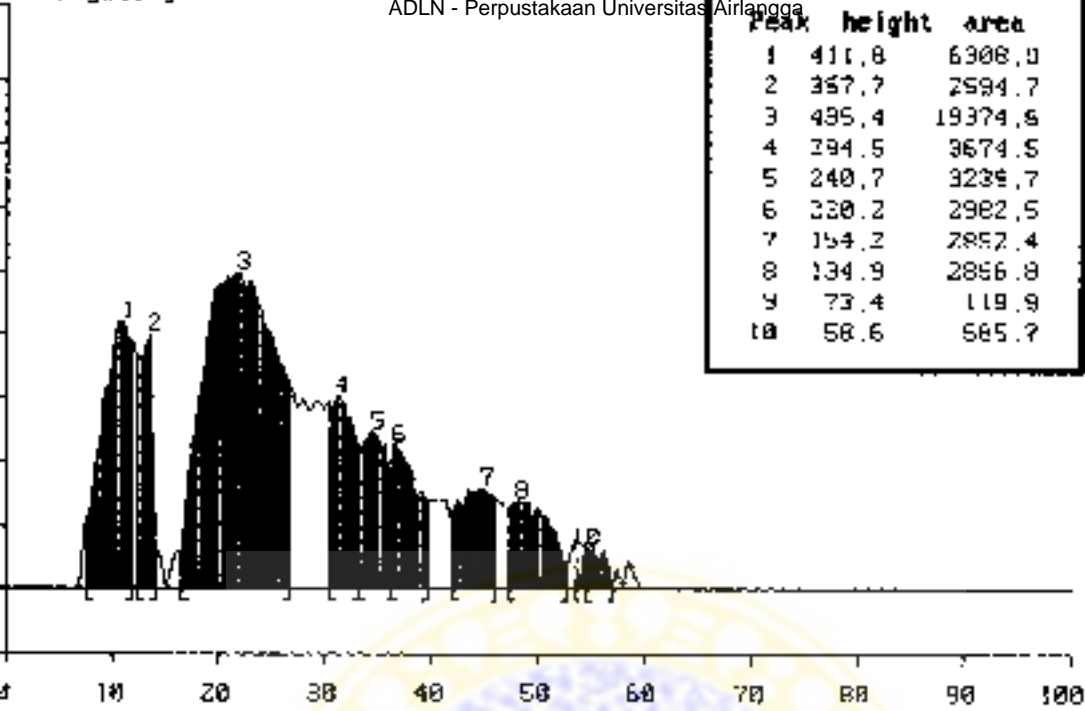
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 [nm]

Wavelength: 573 nm [nm]
 Noise level: 1.450AU, raw data file: DINO25
 S/N: 04010001 CANAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

07

Analysis g:

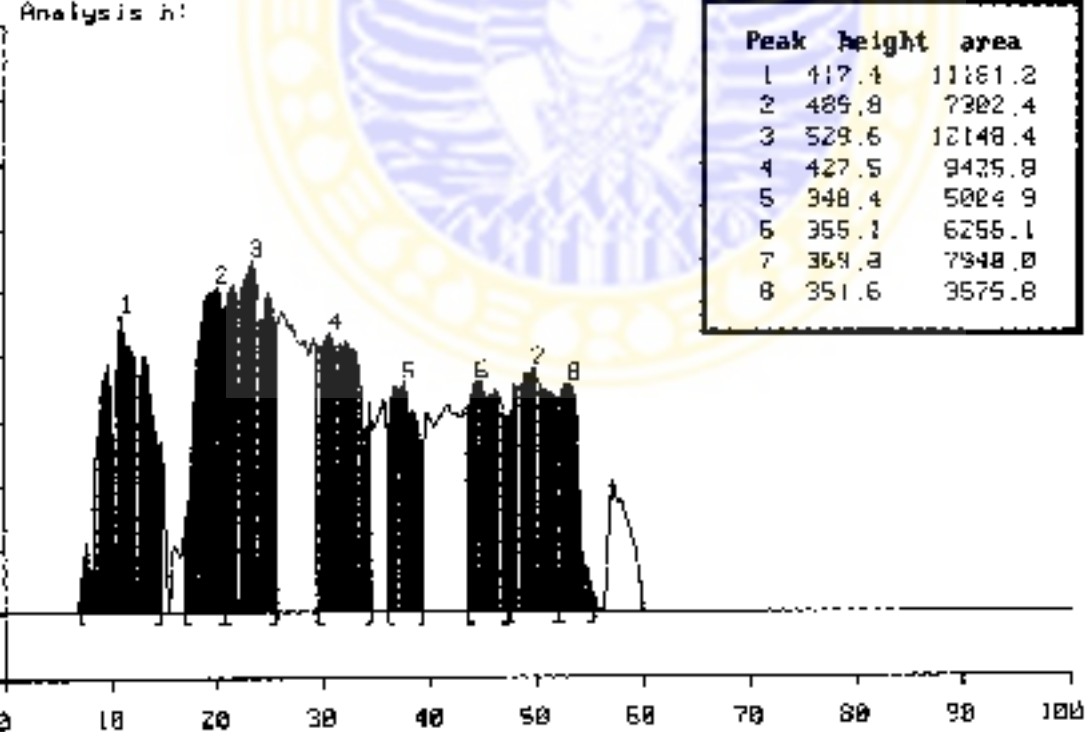
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga



h: 573 nm [nm]
noise level: 1.458AU, raw data file: DINO25
S/N:84018001 CANAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020201

08

Analysis h:

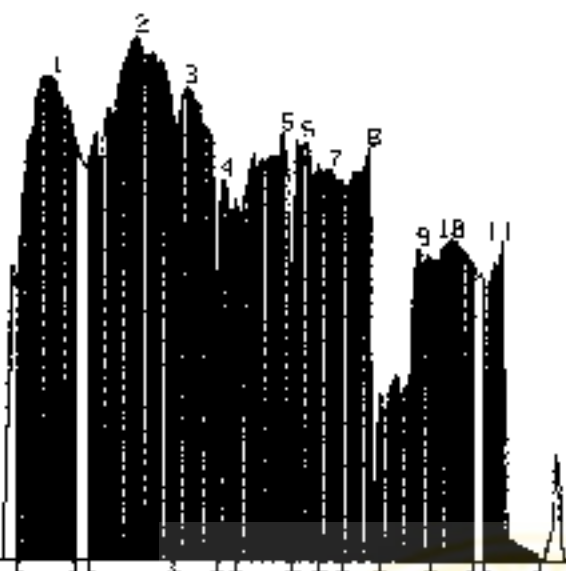


h: 573 nm [nm]
noise level: 1.450AU, raw data file: DINO25
S/N:84018001 CANAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

Analysis i:

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

139



Peak	height	area
1	750.8	18472.2
2	813.0	29365.1
3	732.0	13930.8
4	559.9	4049.2
5	625.3	15427.4
6	653.2	8044.7
7	687.7	6574.7
8	684.1	7930.9
9	473.8	8195.3
10	498.0	9557.8
11	459.6	4632.5

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 [nm]
 h: 573 nm [nm]
 noise level: 1.450AU, raw data file: D1N025
 N:0401001 CAMAC SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

Analysis j:

1310



Peak	height	area
1	90.1	747.7
2	126.3	1292.2
3	157.6	2051.9
4	174.4	1596.2
5	144.7	1758.2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 [nm]
 h: 573 nm [nm]
 noise level: 1.450AU, raw data file: D1N025
 N:0401001 CAMAC SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 020301

PENGARUH UKURAN DIAMETER PERMUKAAN FOLIKEL TERHADAP TINGKAT KEMATANGAN OOSIT SAPI SECARA *IN VITRO*

VINCENTIUS MUBIARTO SETLAWAN

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kematangan oosit sapi secara *in vitro* yang berasal dari berbagai macam ukuran diameter permukaan folikel, yaitu kecil (1-2mm), sedang (3-5mm), besar (6-8mm). Ovarium yang berasal dari Rumah Peternakan Hewan dituci dengan NaCl fisiologis kemudian diukur diameter permukaan keluarnya dengan menggunakan jangka sorong. Setelah itu dikelompokkan menjadi kecil (1-2mm), sedang (3-5mm), besar (6-8mm), kemudian dilakukan aspirasi dengan menggunakan jarum yang berukuran 18G yang dihubungkan dengan spuit Sec berisi isotonik buffer saline. Maturasi oosit dilakukan dalam Tissue culture medium-199 yang telah ditambahkan folikel stimulasi hormone 0,01 µg/ml, bovine serum albumin 10 µg/ml, dan gentamicin sulfat 50 µg/ml, didalam incubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C selama 24 jam. Tingkat kematangan dilihat secara mikroskopis dengan pewarnaan dengan methylene blue 1% dan diperiksa dibawah mikroskop inverted. Penelitian ini terdiri dari 2 kelompok dan 3 ulangan, parameter yang diamati adalah tingkat pematangan oosit yaitu *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle break down* (GVBD), metafase I (MI), dan metafase II (MII). Data tingkat kematangan oosit diolah dengan uji F. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tahap kematangan oosit (MII) paling banyak dijumpai pada folikel berdiameter permukaan besar (100%±0)(P<0,05), kemudian folikel berdiameter permukaan sedang (78,97%± 4,18)(P<0,05), sedang pada folikel berdiameter permukaan kecil tidak terdapat oosit yang matang (belum memasuki tahap MII)(0%±0)(P<0,05). Dari hasil penelitian lebih baik menggunakan folikel berdiameter permukaan besar.

MENGETAHUI KOMISI PEMBIMBING

Pembimbing Pertama



Laporan Penelitian Profil Protein Transforming Growth Factor ...

Prati Susilowati, M.Kes., Dkk

Pembimbing Kedua



Widjati

Budi Santoso, Dkk

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

PERBEDAAN DIAMETER PERMUKAAN FOLIKEL DAN PROSES MATURASI *IN VITRO* TERHADAP TOTAL PROTEIN OOSIT SAPI

Wahyu Kholifah

ABSTRAK

Penyediaan embrio yang berkualitas tinggi dari produk fertilisasi *in vitro* tidak terdapat kualitas oosit yang baik yang dapat menunjang perkembangan lebih lanjut. Oosit yang heterogen diduga menyebabkan proses kapasitasasi oosit tidak berjalan sempurna, akibatnya sintesa protein dan mRNA juga tidak sempurna.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh diameter permukaan folikel terhadap maturasi *in vitro* terhadap total protein oosit.

Oosit yang digunakan berasal dari limbah ovarium Rumah Potong Hewan (RPH) dan diaspirasi dan dikumpulkan berdasarkan ukuran diameter permukaan folikel yaitu 1-2mm, 3-5mm dan 6-12mm. Oosit ini dibagi menjadi dua bagian, satu dimasukkan ke dalam ependorf dan satu bagian yang lain dimaturasi *in vitro*. Oosit yang telah dimaturasi kemudian dimasukkan ke dalam ependorf dan bersama-sama dengan oosit yang belum dimaturasi untuk kemudian dilakukan pemeriksaan total protein. Kelompok P3 berturut-turut adalah oosit dari folikel dengan diameter permukaan 6-12mm dan 1-2mm, sedangkan P4, P5 dan P6 adalah oosit dari folikel dengan diameter permukaan 6-12mm, 3-5mm, dan 1-2mm yang telah mengalami proses maturasi *in vitro*.

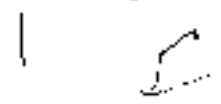
Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola Faktorial 2 X 3 dan tujuh ulangan. Faktor yang diteliti adalah diameter permukaan folikel dan proses maturasi *in vitro* terhadap total protein oosit. Analisa data dilakukan dengan Anova dan apabila perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT 5% Duncan.

Hasil total protein rata-rata yang didapat pada masing-masing perlakuan adalah P1: 19376,86; P2: 21504,29; P3: 22910,04; P4: 20461,43; P5: 9305,17; P6: 28715,43; P7: 11498,80; P8: 11673,64 dan P9: 25120,00; P10: 11091,51. Hasil analisa ternyata tidak ada perbedaan yang nyata ($F_{hitung} < F_{tabel}$) antara perbedaan diameter folikel dan proses maturasi *in vitro* terhadap total protein oosit.

MENGETAHUI KOMISI PEMBIMBING

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua



Bambang Puernomo, M.Si., Drh.
NIP. 130 701 131

Suberai Susilowati, M.Kes., Drh.
NIP. 131 653 734