

**KUALITAS OOSIT SAPI BALI SETELAH PEMBEKUAN
DENGAN PENAMBAHAN *GLUTATHION SULFIHIDRIL* (GSH)
PADA MEDIA ADAPTASI**

SKRIPSI



**JURUSAN PETERNAKAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BOSOWA
MAKASSAR**

2023

**KUALITAS OOSIT SAPI BALI SETELAH PEMBEKUAN
DENGAN PENAMBAHAN *GLUTATHION SULFIHIDRIL* (GSH)
PADA MEDIA ADAPTASI**

SKRIPSI

ANDI MEGAWATI

45 19 035 011

BOSOWA

**Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Pada Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian
Universitas Bosowa Makassar**

**JURUSAN PETERNAKAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BOSOWA
MAKASSAR**

2023

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Kualitas Oosit Sapi Bali Setelah Pembekuan Dengan Penambahan *Glutathion sulfhidril* (GSH) Pada Media Adaptasi.

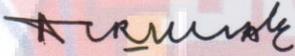
Nama : Andi Megawati

Stambuk : 45 19 035 011

Program Studi : Peternakan

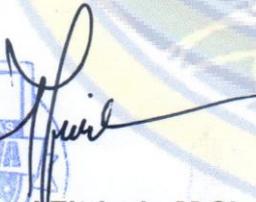
Fakultas : Pertanian

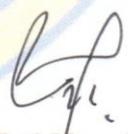
Telah diperiksa dan disetujui oleh :


Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP.
Pembimbing I


Ahmad Muchlis, S.Pt, M.Si
Pembimbing II

Mengetahui,


Ir. Andi Tenri Fitriyah, M.Si., Ph.D
Dekan Fakultas Pertanian


Dr. Ir. Tati Murniati, M.P
Ketua Jurusan

Tanggal Lulus : 24 Agustus 2023

PERNYATAAN KEORISINILAN SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Andi Megawati

Stambuk : 45 19 035 011

Program Studi : Peternakan

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul " Kualitas Oosit Pada Sapi Bali Setelah Pembekuan Dengan Penambahan Glutathion Sulfidril (GSH) Pada Media Adaptasi". Merupakan karya tulis seluruh ide yang ada dalam skripsi ini, kecuali yang saya nyatakan sebagai kutipan merupakan ide yang saya susun sendiri. Selain itu, tidak ada bagian dari skripsi ini yang telah digunakan sebelumnya untuk memperoleh gelar atau sertifikat akademik.

Jika pernyataan di atas terbukti sebaliknya, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah diterapkan oleh Fakultas Pertanian Universitas Bosowa Makassar

Makassar, 24 Agustus 2023



Andi Megawati
Andi Megawati

RINGKASAN

Kualitas oosit sapi Bali setelah pembekuan dengan penambahan *glutathion sulfihidril* (GSH) pada media adaptasi (di bawah bimbingan Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP sebagai pembimbing utama dan Ahmad Muchlis, S.Pt, M.Si sebagai pembimbing anggota).

Produksi embrio secara *in vitro* dibutuhkan oosit berkualitas dalam jumlah besar selanjutnya dilakukan *kriopreservasi* oosit yang merupakan suatu cara untuk menyimpan embrio dalam bentuk beku. Proses kultur oosit dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif, menimbulkan *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal bebas. Radikal bebas merupakan kelompok molekul kimia yang tidak stabil dan sangat reaktif yang dapat menyebabkan kerusakan sel, sehingga dibutuhkan suatu bahan antioksidan yaitu *Glutathion sulfihidril* (GSH) dalam media adaptasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kualitas oosit sapi Bali setelah di-*thawing* dengan penambahan GSH pada media adaptasi setelah pembekuan.

Penelitian dilaksanakan bulan Maret-Mei 2023, menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan penambahan GSH pada media adaptasi yaitu P0 (kontrol), P1 (0,5mM), P2 (1mM), P3 (1,5mM) dengan 6 kali ulangan.

Parameter penelitian adalah morfologi oosit (viabilitas, zona pelusida fraktur, penyusutan, dan lisis) setelah pembekuan dan pencairan kembali. Data dianalisis menggunakan ANOVA dibantu program software SPSS v16, jika terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh penambahan GSH terhadap: pada viabel P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 57.38^a, 73.88^b, 75.00^b, dan 72.36^b (P<.05), dan penyusutan sitoplasma P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 27.02^b, 20.00^{ab}, 5.55^a, 16.52^{ab} (P<.05). Persentase oosit yang viabel pada perlakuan GSH nyata lebih tinggi (P<0,05) dibanding kontrol. Sedangkan penyusutan sitoplasma, perlakuan 1mM (GSH) nyata lebih rendah (P<0,05) dibanding kontrol, 0,5mM dan 1,5mM. *Glutathione sulfihidril* adalah suatu thiol tripeptida (*γ-glutamylcysteinylglycine*) yang merupakan komponen *sulphydryl* non protein berperan penting dalam detoksifikasi dan antioksidan seperti memelihara kondisi redoks 21 intraseluler dan melawan stress oksidatif. Sedangkan pada zona pelusida fraktur (P0, P1, P2 dan P3 berturut-turut 5.11^a, 0.00^a, 2.77^a, 0.00^a) dan sitoplasma lisis (P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 12.00^a, 6.11^a, 16.66^a, 11.11^a) tidak menunjukkan pengaruh (P>.05). *Glutathione* memiliki fungsi, antara lain mempertahankan reaksi redoks pada sel yang dikultur, meningkatkan produksi, protein, DNA, serta menghambat reaksi sulfasi. Disimpulkan bahwa penambahan antioksidan GSH pada media adaptasi menunjukkan 1mM (75.00%) memiliki tingkat viabel yang paling tinggi dibanding dengan kontrol (57.38%) dan perlakuan 0,5mM (73.88%), dan 1,5mM (72.36%).

Kata Kunci : Kualitas, Oosit, Sapi Bali, *Glutathione Sulfihidril*.

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah, dengan mengucapkan puji dan syukur, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena dengan izin, karunia, dan hidayahNya, penulisan skripsi yang berjudul “Kualitas Oosit Sapi Bali Setelah Pembekuan dengan Penambahan *Glutathione sulfhidril* (GSH) pada Media Adaptasi” dapat diselesaikan.

Penulisan skripsi ini untuk memenuhi salah satu syarat Program pada Jurusan Peternakan di Universitas Bosowa Makassar. Penulisan Skripsi ini tidak lepas dari bantuan serta petunjuk dari Ibu Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP. sebagai pembimbing utama dan Bapak Ahmad Muchlis, S.Pt., M.Si. sebagai pembimbing anggota.

Penulis menyadari, berhasilnya studi dan penyusunan Skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak yang telah memberikan semangat dan do'a kepada penulis, sehingga sepatutnya pada kesempatan ini penulis menghaturkan rasa terima kasih kepada :

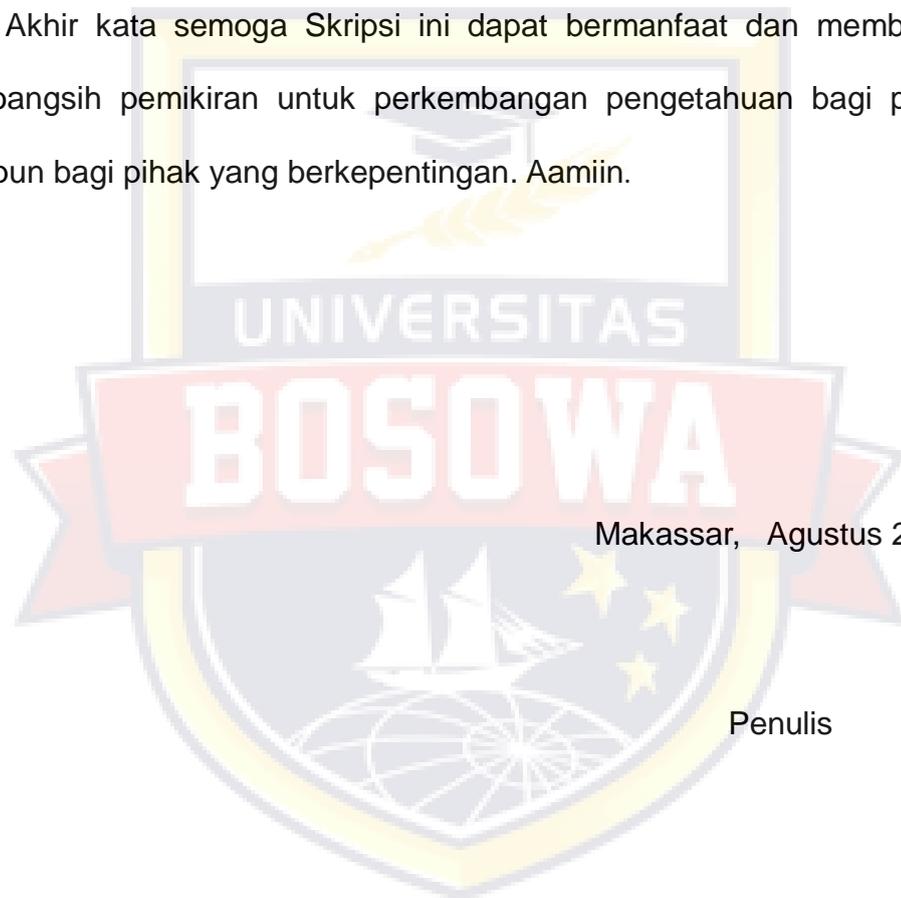
1. Ayahanda Andi Saini dan Ibunda Sitti Hadia yang telah membesarkan penulis dengan segala rasa cinta dan kasih sayang yang tidak pernah surut serta memberikan dukungan baik berupa materi, do'a juga menjadi support system terbaik kepada penulis.
2. Ir. Andi Tenri Fitriyah, M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Bosowa Makassar.

3. Dr. Ir. Tati Murniati, MP. selaku Ketua Prodi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Bosowa Makassar.
4. Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP. selaku pembimbing utama dan Ahmad Muchlis, S.Pt., M.Si. sebagai pembimbing anggota dengan ketulusan hati telah meluangkan waktu untuk memberikan petunjuk dan masukan-masukan yang sangat berguna bagi penulis selama penelitian sampai selesainya penulisan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Ir. Asmawati, MP. dan Bapak Dr. Ir. Syarifuddin, S.Pt., MP. selaku penguji yang banyak memberikan masukan dan wawasan pengetahuan ilmu peternakan.
6. Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DEA., DES. selaku Kepala Lab Produksi *Embryo in Vitro* Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan motivasi, arahan, dan ilmu yang bermanfaat.
7. Dr. Erni Damayanti S.Pt., MP. yang telah mengajarkan teknik kultur oosit sapi Bali secara *in vitro* dan membantu penulis dalam penelitian ini.
8. Dosen Jurusan Peternakan dan Tenaga Kependidikan Fakultas Pertanian Universitas Bosowa Makassar.
9. Teman-teman seperjuangan penelitian, Armitha Pratiwi, Taufik Hidayat, dan Kana Ary yang telah membantu serta bersama-sama melewati suka duka dari awal hingga selesai penelitian.
10. Keluarga Besar Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) sebagai wadah membina talenta kepemimpinan penulis.

11. Teman-teman seperjuangan Peternakan Angkatan 2019 yang memberikan masukan, dukungan, bantuan dan sarannya. Semoga persaudaraan dan kebersamaan tidak akan pudar sampai kapanpun.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya.

Akhir kata semoga Skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan sumbangsih pemikiran untuk perkembangan pengetahuan bagi penulis maupun bagi pihak yang berkepentingan. Aamiin.



Makassar, Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEORSINILAN SKRIPSI	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	5
C. Manfaat Penelitian.....	5
D. Hipotesis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Ovarium	6
B. Folikulogenesis.....	7
C. Oogenesis	10
D. Maturasi In Vitro	13
E. Kriopreservasi	16
F. Antioksidan GSH	18
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat Penelitian	21
B. Alat dan Bahan.....	21
C. Prosedur Penelitian	21
D. Desain Penelitian	24

E. Pengamatan dan Analisis Data.....	24
--------------------------------------	----

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Oosit Setelah Pembekuan	26
--	----

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN	30
---------------------	----

B. SARAN	30
----------------	----

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR LAMPIRAN



DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Halaman
	1. Parameter oosit viabel dan tidak viabel pascavitrifikasi-pencairan kembali pada media adaptasi dengan penambahan (GSH) yang berbeda.....	27



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Teks	Halaman
	2. Proses Folikulogenesis.....	8
	3. Proses Oogenesis	10
	4. Prosedur Penelitian	25
	5. Oosit Sapi Bali Pascavitrifikasi-Pencairan kembali	26



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Produksi embrio *in vitro* merupakan alternatif yang bisa dimanfaatkan untuk mendapatkan embrio dalam program transfer embrio. Produksi embrio secara *in vitro* yang meliputi maturasi oosit, fertilisasi, dan kultur *in vitro* telah dilakukan pada hewan ternak kambing dan sapi. Guna meningkatkan nilai tambah oosit sehingga dapat dipergunakan tanpa dibatasi oleh kendala waktu dan jarak melalui metode *kriopreservasi*. Teknik *kriopreservasi* oosit merupakan suatu cara untuk menyimpan embrio dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin, dan mempertahankan kelangsungan hidup sel (Wajuningsih dkk., 2013).

Proses pembekuan (*kriopreservasi*) merupakan salah satu bentuk solutif dari permintaan daging yang terus meningkat dan menyebabkan terjadinya pemotongan sapi betina produktif. Teknik *Kriopreservasi* ini merupakan salah satu cara untuk ternak betina yang produktif dapat dikembangkan walaupun ternak tersebut sudah mati.

Teknik *kriopreservasi* oosit pada mamalia sampai saat ini dilakukan dengan dua cara yaitu pembekuan lambat (*slow rate freezing*) dan vitrifikasi (*rapid freezing*). *Slow rate freezing* merupakan cara penyimpanan oosit dalam keadaan beku pada temperatur rendah yaitu -196⁰C dengan meminimalkan pembentukan kristal es intraselular,

sedangkan vitrifikasi cara penyimpanan oosit tanpa adanya pembentukan kristal es, pembentukan es kristal akan menyebabkan kerusakan intraselular saat pembekuan (Liebermann dkk., 2002).

Larutan vitrifikasi dengan bahan dasar *etilen glikol* (EG) banyak digunakan untuk kriopreservasi *praimplantasi* semua tahapan *in vivo*. Tidak terjadi penurunan yang signifikan dari viabilitas baik *in vitro* maupun *in vivo*. Larutan vitrifikasi yang terdiri dari 15% (v/v) EG, 15% (v/v) *dimethylsulfoxide* (DMSO) atau *1,2-propanediol* (PROH), dan 0,5 mol/L sukrosa mempunyai kadar toksik rendah dan dapat digunakan untuk vitrifikasi. *Etilen glikol* merupakan komponen penting dalam larutan vitrifikasi karena mempunyai karakteristik toksisitas rendah dan permeasi yang cepat terhadap sel. Beberapa penelitian menggunakan kombinasi dengan *krioprotektan* lain seperti DMSO atau PROH untuk mengurangi konsentrasi dari satu *krioprotektan* dalam rangka mengurangi toksisitas tertentu terhadap oosit. *Krioprotektan* yang *non-permeabel* dapat memfasilitasi dehidrasi dan vitrifikasi sehingga dapat juga diterapkan dalam kombinasi larutan vitrifikasi. Sukrosa telah menjadi komponen standar dalam larutan vitrifikasi, selain itu penambahan makromolekul lain seperti *Ficoll* dapat menstabilkan pembentukan kristal es dengan membentuk lapisan pelindung di sekitar oosit (Pamungkas, 2010).

Keberhasilan produksi embrio *in vitro* (PEIV) ditentukan oleh sistem yang digunakan yaitu sistem PEIV yaitu dilakukan pada kondisi temperatur 38,5°C dan 5 % CO₂ serta kelembapan yang tinggi. Apabila hal tersebut

tidak ada maka akan terjadi *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal bebas. Radikal bebas merupakan kelompok molekul kimia yang tidak stabil dan sangat reaktif dengan 2 satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga untuk memperoleh pasangan elektronnya senyawa ini bereaksi dengan atom atau molekul lain seperti asam lemak tidak jenuh, protein, asam nukleat atau *lipopolisakarida* (Fausiah, 2014). Upaya mengeliminir dampak dari ROS ini maka perlu ditambahkan suatu bahan yang mengandung antioksidan.

Penambahan insulin transferrin selenium (ITS) ke dalam medium maturase oosit kambing efektif meningkatkan kematangan inti sel oosit pada ivm (Firmiaty, dkk., 2014).

Hasil penelitian Hasbi dkk. (2012) menunjukkan penambahan GSH pada medium Maturasi telah persentase oosit yang mencapai tahap MII setelah proses pematangan berturut-turut adalah kontrol (79,71%), penambahan 0,25 mM GSH (79,07%), 0,5 mM GSH (80,95%), dan 1 mM GSH (84,13%). Adapun penambahan GSH pada medium vitrifikasi menunjukkan oosit yang hidup adalah 69,70% (0 mM), 72,73% (0,5 mM), 76,47% (1 mM), dan 77,14% (1,5 mM). Hasilnya cenderung meningkat seiring dengan penambahan glutathione konsentrasi (Gunawan dkk., 2018). Sedangkan penambahan GSH pada medium fertilisasi dengan konsentrasi yang berbeda dapat meningkatkan total oosit terfertilisasi dan tingkat fertilisasi (2PN) jika dibandingkan dengan kontrol ($P < 0,05$). Hal tersebut diduga karena GSH memiliki peran penting dalam pembentukan

pronukleus. Terdapat tiga peran GSH dalam meningkatkan pembentukan pronukleus. Peran pertama, GSH mampu berperan sebagai antioksidan dengan menetralkan H_2O_2 dan L-OOH yang dikatalisis oleh enzim *glutathione peroxidases* (GPx) (Lu, 2013).

Informasi tentang penambahan GSH pada medium adaptasi yaitu medium sebelum masuk ke tahap fertilisasi belum banyak diketahui, oleh karena itu dilakukan penelitian tentang Kualitas Oosit Sapi Bali Setelah Pembekuan dengan Penambahan *Glutathione sulfhidril* (GSH) pada Media Adaptasi.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kualitas oosit sapi Bali setelah di-*thawing* dengan penambahan GSH pada media adaptasi setelah pembekuan.

C. Manfaat Penelitian

1. Pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang teknologi reproduksi dan salah satu upaya untuk meningkatkan produksi embrio beku.
2. Pengetahuan bagi mahasiswa, peneliti, dosen maupun instansi terkait tentang pemanfaatan antioksidan *Glutathione Sulfhidril* (GSH) pada media adaptasi upaya meningkatkan kualitas oosit pada sapi Bali setelah pembekuan.

D. Hipotesis

Diduga bahwa penambahan antioksidan GSH pada media adaptasi, embrio dapat meningkatkan kualitas embrio pada sapi Bali setelah pembekuan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Ovarium

Ovarium adalah organ primer (esensial) reproduksi pada betina seperti halnya testes pada hewan. Ovari dapat dianggap bersifat endokrin atau sitogenik (menghasilkan sel) karena mampu menghasilkan hormon yang akan diserap langsung ke dalam peredaran darah, dan juga ovum. Ovarium merupakan sepasang kelenjar, terdiri dari ovari kanan yang terletak di belakang ginjal kanan dan ovari kiri terletak di belakang ginjal kiri. Ovarium seekor sapi betina bentuknya menyerupai biji buah almond dengan berat rata-rata 10 sampai 20 gram. Sperma pejantan yang berkembang di tubulus seminiferus terletak di dalam jaringan betina yang menghasilkan ovum (telur) berada sangat dekat dengan permukaan ovari (Astuti, 2018).

Mamalia memiliki ovarium berbentuk lonjong seperti anggur. Memiliki warna merah hati, diyakini bahwa warna merah hati ovarium disebabkan oleh efek hormonal dan kapiler darah (Rafli dkk., 2018).

Ovarium mengandung folikel-folikel yang didalamnya terdapat masing-masing satu ovum. Pembentukan dan pertumbuhan folikel ini dipengaruhi oleh hormon FSH (*Folicle stimulating hormone*) yang dihasilkan oleh kelenjar *adeno hipofise*. Folikel di dalam ovarium terdiri dari beberapa tahap yaitu folikel primer, terbentuk sejak masih dalam kandungan dan mengandung oogonium yang dikelilingi oleh satu lapis sel

folikuler kecil; folikel sekunder, terbentuk setelah hewan lahir dan sel folikulernya lebih banyak; folikel tertier, terbentuk pada saat hewan mencapai dewasa dan mulai mengalami siklus berahi; dan yang terakhir adalah folikel de Graaf, merupakan folikel terbesar pada ovarium pada waktu hewan betina menjelang berahi (Astuti, 2018).

Ukuran ovarium tidak mempengaruhi jumlah oosit yang dihasilkan, namun jumlah dan kualitas oosit dipengaruhi oleh jumlah folikel yang terdapat pada ovarium. Folikel dengan ukuran sedang 3-6 mm menghasilkan kualitas oosit yang baik dari folikel ukuran sedang, hal ini disebabkan karena meningkatnya kualitas oosit pada folikel besar oleh lingkungan intrafolikuler yang dapat memperbaiki kualitas oosit. Lingkungan intrafolikular mengandung hormon *steroid* dan peptida, faktor-faktor pertumbuhan, *sitokin*, dan molekul-molekul lain yang mempengaruhi oosit dan perkembangan folikel (Ridwan, 2020).

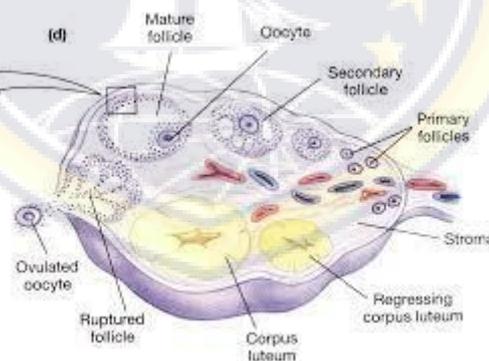
B. Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses pematangan folikel pada korteks ovarium yang mencakup beberapa proses yaitu rekrutmen, seleksi, pertumbuhan, pematangan dan ovulasi (Campbell dkk., 2010).

Sejak lahir, pada ovarium terdapat sejumlah folikel *primordial imatur* yang mengandung oosit primer yang juga *imatur*. Folikel *primordial* mengalami perubahan karakter histologis dan fisiologis dimana akan terbentuk baik folikel tersier maupun folikel antral. Proses ini bergantung pada berbagai jenis hormon yang menyebabkan kecepatan

folikulogenesis dan *oogenesis* yang berakhir adanya ovulasi atau sebaliknya atresia folikel (Pusfita, 2017).

Folikulogenesis dimulai dengan diambilnya folikel *primordial* ke dalam suatu kumpulan yang berisi folikel-folikel yang sedang tumbuh berkembang dan dapat diakhiri baik dengan ovulasi atau mati menjadi *atresia*. Pada wanita, *folikulogenesis* merupakan proses yang sangat panjang, membutuhkan waktu kira-kira 1 tahun untuk folikel *primordial* tumbuh dan berkembang mencapai stadium ovulasi. *Folikulogenesis* dapat dibagi menjadi dua fase. Fase yang pertama, disebut juga preantral atau fase *gonadotropin-independen*, ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi dari oosit. Fase yang kedua, disebut antral (Graaf) atau fase *gonadotropin-dependen*, ditandai dengan peningkatan pesat dari ukuran folikel itu sendiri (sampai kira-kira 25 mm) (Anwar, 2005).



Gambar 1. Proses folikulogenesis
Sumber: (Ridwan, 2020)

Follicle Stimulating Hormone bersama dengan *growth factor* dapat merangsang sel-sel kumulus untuk memproduksi dan mensekresikan

asam *hyaluronic* yang akan mendispersikan sel yang mana proses ini disebut ekspansi atau mucifikasi (Pranatasari dkk., 2016).

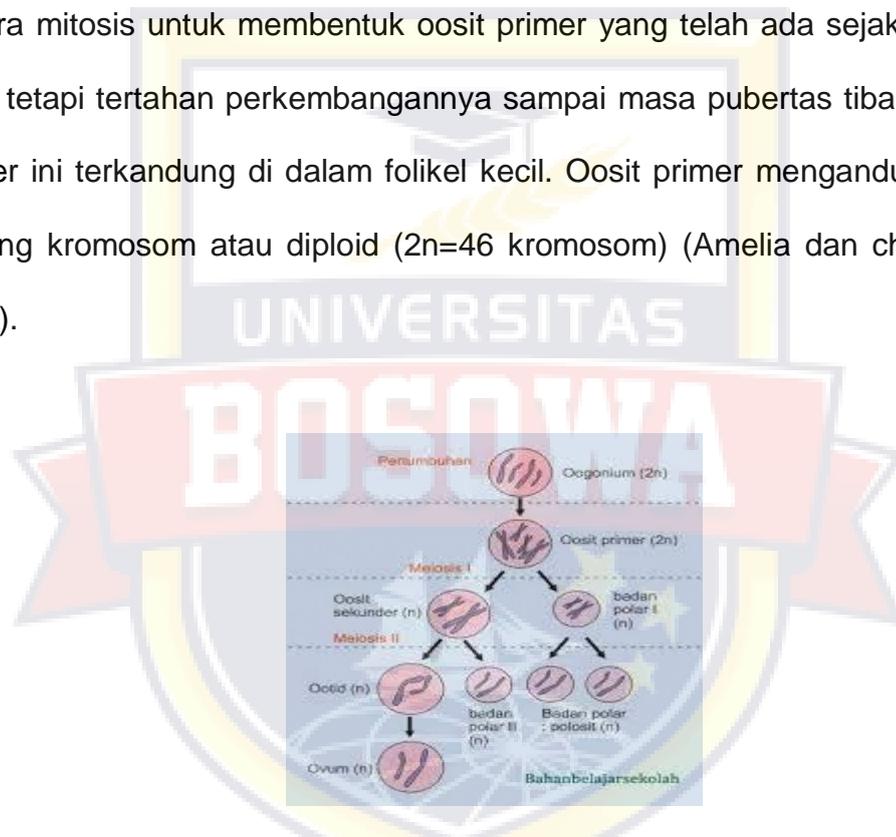
Hubungan antara hormon-hormon hipotalamus hipofisa yakni *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), hormon-hormon ovarium *estrogen*, *progesteron* dan hormon uterus *prostaglandin*. Sinkronisasi estrus dapat dilakukan dengan pemberian hormon GnRH, *estrogen*, *progesteron* dan PGF2 α atau pemberian kombinasi keempatnya. *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) akan menstimulasikan sel-sel *gonadotroph* kelenjar *pituitari* untuk mensekresikan FSH dan LH. Hormon FSH dan LH akan bekerja pada sel target dari gonad, FSH akan menstimulasikan sel-sel granulosa untuk memfasilitasi proses oogenesis dan bertanggung jawab atas perkembangan dan pematangan folikel dan LH berfungsi untuk ovulasi (Kurniawan dkk., 2019).

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) merupakan struktur dekapeptida yang disintesis di daerah *nukleus arkuatus hipotalamus*. Pada hipotalamus dapat ditemukan dua pusat yang berbeda fungsinya. Pusat-pusat ini merupakan pusat tonik di daerah *ventromedial nukleus arkuatus* dan pusat siklik di daerah preoptikus dekat nukleus *suprakiasmatika*. Pusat siklik berfungsi mengatur pengeluaran LH pada pertengahan siklus haid, sedangkan pusat tonik mengatur kebutuhan basal harian hormon *gonadotropin*. Melalui inti-inti tersebut, GnRH disekresikan ke *hipofisis* melalui jalur sirkulasi portal *hipofisis-hipotalamus*

dan berikatan dengan reseptor permukaan sel *gonadotropin* di hipofisis anterior (Suparman dan Suparman, 2016).

C. Oogenesis

Oogenesis dimulai di dalam embrio betina, yang menghasilkan oogonium dari sel punca (*stem cell*) *primordial*. Oogonium membelah secara mitosis untuk membentuk oosit primer yang telah ada sejak masa bayi, tetapi tertahan perkembangannya sampai masa pubertas tiba. Oosit primer ini terkandung di dalam folikel kecil. Oosit primer mengandung 23 pasang kromosom atau diploid ($2n=46$ kromosom) (Amelia dan cholifah, 2018).



Gambar 2. Proses Oogenesis
Sumber : (Amelia dan cholifah, 2018)

Kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium yang berasal dari RPH menjadi salah satu indikator keberhasilan dalam upaya penyimpanan ovarium. Salah satu kriteria oosit yang berkualitas adalah keberadaan sel-sel kumulus yang berada di sekeliling oosit. Sel-sel kumulus ini berfungsi sebagai sumber nutrisi dan pengatur regulasi sinyal yang berkaitan dengan hormon. Selain itu, keberadaan sel-sel kumulus berkontribusi

terhadap pematangan oosit. Hal ini terbukti dengan penghilangan sel-sel kumulus pada oosit terbukti mengganggu pematangan sitoplasma oosit secara *in vitro* (Zhou dkk., 2016).

Sel-sel granulosa menyediakan substrat energi, beberapa asam amino, nukleotida dan prekursor fosfolipid ke oosit yang menghasilkan beberapa interaksional sinyal yang mempengaruhi inti sel dan sintesis protein struktural tertentu serta pematangan protein spesifik. Morfologi oosit dengan kumulus yang kompleks berkaitan dengan perannya pada proses pematangan oosit *in vitro*. Semakin banyak lapisan pada oosit maka semakin baik (Kakkassery dkk., 2010).

Oosit yang telah dihilangkan sel-sel kumulusnya kemudian dikultur dengan penambahan sel kumulus pada mediumnya ternyata dapat meningkatkan pematangan sitoplasma oosit (Feng dkk., 2013).

Kualitas oosit ditentukan oleh keberadaan sel kumulus. Peranan sel kumulus ini berhubungan dengan mekanisme *gap junction*, pengatur regulasi sinyal yang berkaitan dengan hormon dan kemampuan metabolisme oosit (Rahma dkk., 2020).

Teknik lain dalam koleksi oosit adalah teknik penyayatan (*slicing*). Ovarium ditempatkan pada cawan petri yang telah diberi 5 ml medium koleksi dan ovarium ditahan menggunakan pinset. Kemudian folikel yang tampak pada permukaan ovarium disayat dengan menggunakan bantuan pisau *scalpel blade*. Cairan folikel akan mengalir dan bersamaan dengan cairan tersebut oosit juga akan keluar dan dapat dikoleksi dengan

pengamatan di bawah mikroskop. Sayatan pada teknik ini perlu diperhatikan agar tidak mengenai pembuluh darah karena medium menjadi keruh dan menyulitkan proses koleksi oosit saat dievaluasi di bawah mikroskop. Teknik lain menggunakan puncture, dilakukan dengan menusuk bagian folikel yang terlihat pada permukaan ovarium dengan bantuan jarum (Hoque dkk., 2011).

Oosit yang dikoleksi dikategorikan menjadi 4 grade berdasarkan kualitasnya: grade A adalah oosit yang memiliki kumulus yang seragam dan kompak dengan dikelilingi oleh lima lapisan atau lebih sel kumulus. Oosit dengan grade B adalah oosit yang memiliki sitoplasma yang gelap dengan komplemen dari korona radiata yang lengkap tetapi dikelilingi tidak lebih dari lima lapis sel kumulus. Oosit dengan grade C adalah oosit yang ditandai dengan oosit yang kurang seragam dan warna sitoplasma lebih transparan dan tidak merata serta terlihat tidak kompak. Oosit dengan kategori D mempunyai sitoplasma yang transparan bahkan terdapat fragmentasi pada sitoplasma. Sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit terlihat sangat jarang dan bahkan beberapa oosit tidak memiliki sel kumulus (Handarini dkk., 2014; Firmiaty *et al.*, 2014).

Meskipun adanya persamaan antara spermatogenesis dengan oogenesis, yaitu keduanya mengalami pembelahan meiosis, akan tetapi rincian proses dan produksinya sangat berbeda. Perbedaan ini berkorelasi dengan fungsi terspesialisasi dari kedua jenis gamet tersebut. Spermatozoa harus dapat bergerak dan mendatangi ovum di dalam

saluran reproduksi, sedangkan ovum harus mengandung substansi nutrisi untuk embrio yang akan terbentuk setelah terjadi fertilisasi sehingga volume ovum besar dan pasif tidak dapat bergerak sendiri (Amelia dan cholifah, 2018).

D. Maturasi *in Vitro* (IVM)

Pematangan oosit secara *in vitro* merupakan pematangan oosit yang dilakukan menggunakan medium dil luar tubuh ternak. Maturasi oosit secara *in vitro* merupakan pemasakan oosit yang dilakukan menggunakan medium di luar tubuh ternak. Oosit yang matang ditandai dengan keadaan oosit dengan sel kumulus yang sudah mengembang dan oosit telah sulit untuk dipisahkan (Ridwan, 2020).

Pematangan *in vitro* (IVM) oosit adalah teknik baru yang memungkinkan oosit yang belum matang diambil dari betina untuk mencapai kedewasaan mereka di media buatan di luar kondisi alam. Bisa diterapkan baik dalam siklus ovarium alami atau terstimulasi (Silvia, 2015).

Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke metafase II (MII). Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk *Germinal Vesicle* (GV) dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD). Setelah *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD) terjadi, kromosom dibungkus oleh *mikrotubulus* dan *mikrofilamen* yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami *Germinal Vesicle*

Breakdown (GVBD) selanjutnya akan mencapai tahap metafase I (MI) dan berakhir pada tahap metafase II (MII). Oosit yang berada pada tahap metafase II (MII) merupakan oosit yang telah matang dan siap untuk dilakukan fertilisasi (Widyastuti dkk., 2015).

Tingkat maturasi oosit dinilai berdasarkan dua kriteria yaitu pada tingkat maturasi inti (*nuclear maturation*) dan maturasi sitoplasma (*cytoplasmic maturation*) (Nurchahyo dan Ciptono, 2013).

Kualitas oosit yang dikoleksi dan proses pematangannya secara *in vitro* (maturasi *in vitro*) menjadi salah satu kunci awal yang menentukan keberhasilan perkembangan embrio pada tahap selanjutnya. Kualitas dan tingkat kompetensi oosit ternak muda memiliki perbedaan dibandingkan dengan ternak dewasa (Palmerini dkk., 2014).

Diameter folikel sebagai tolak ukur keberhasilan IVM. Kemampuan maturasi oosit secara *in vitro* lebih rendah daripada *in vivo*, sehingga medium maturasi oosit pada produksi embrio *in vitro* sering ditambahkan berbagai komponen, antara lain hormon gonadotropin, serum, dan antioksidan (Novitasari dkk., 2022).

Maturasi *in vitro* merupakan tahapan krusial pada fertilisasi secara *in vitro*, karena pada tahap ini oosit akan melanjutkan perkembangan sampai tahap metaphase II sehingga dapat difertilisasi dan mampu berkembang ke tahap lebih lanjut. Pada proses IVM diperlukan media pematangan yang tepat sehingga nutrisi dan komponen yang diperlukan untuk proses perkembangan oosit tersebut. Salah satu komponen utama yang

diperlukan dalam media pematangan adalah serum. Serum mengandung beberapa komponen esensial seperti: protein, hormone, faktor-faktor yang mendukung pertumbuhan (*growth factor*) yang sangat diperlukan oosit pada proses maturasi, fertilisasi, maupun perkembangan embrio (Widyastuti dkk., 2015).

Proses maturasi oosit akan terjadi metabolisme sel yang menghasilkan oksidan (radikal bebas) yang dapat menyebabkan kematian sel oleh karenanya penambahan antioksidan pada medium maturasi merupakan hal yang sangat penting (Bintara dkk., 2015).

Proses *in vitro*, level dari *endogenous* antioksidan lebih rendah dibandingkan pada *in vivo* terutama pada saat kultur dari oosit dan embrio. Faktor rendahnya level *endogenous* antioksidan mengindikasikan perlunya dilakukan penambahan antioksidan pada media maturasi (Novitasari dkk., 2022).

Media maturasi oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tissue Culture Media* 199 (TCM 199) yang ditambah penisilin 100 IU/ml, *streptomisin* 100 µg/ml dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Sigma, USA) 0,01 mg/ml. Selanjutnya media maturasi disuplementasi dengan FBS sebanyak 10 % (Widyastuti dkk., 2017).

Oosit dikultur pada drop media maturasi sebanyak 100 µl dan berisi 10 oosit, kemudian ditutup dengan mineral oil. Kultur oosit kemudian dilakukan pada inkubator bersuhu 38,5°C dengan konsentrasi CO₂ sebanyak 5% selama 24 jam (Prastowo dkk., 2016).

E. Kriopreservasi

Kriopreservasi merupakan metode teknologi reproduksi yang berguna untuk embrio dan pengawetan makhluk yang hampir punah. *Kriopreservasi* oosit pada mamalia sampai saat ini dilakukan dengan dua cara yaitu pembekuan lambat (*slow rate freezing*) dan vitrifikasi (*rapid freezing*). *Slow rate freezing* merupakan cara penyimpanan oosit dalam keadaan beku pada temperatur rendah dengan meminimalkan pembentukan kristal es intraselular, sedangkan vitrifikasi cara penyimpanan oosit tanpa adanya pembentukan kristal es, pembentukan es kristal akan menyebabkan kerusakan intraselular saat pembekuan (Liebermann dkk., 2002).

Pembentukan kristal es terjadi antara suhu -5 dan -80°C merupakan sumber utama kerusakan oosit. Strategi yang ditempuh untuk meminimalisir efek tersebut adalah dengan penambahan krioprotektan ke dalam media dan pengontrolan terhadap laju perubahan temperatur. Salah satunya adalah dengan mengaplikasikan metode vitrifikasi, kondisi yang cairan tersolidifikasi sehingga dapat mencegah efek letal pada sel. Pada metode vitrifikasi, oosit melewati zona temperatur yang berbahaya dengan sangat cepat dan waktu pemaparan yang sangat pendek pada temperatur yang berbahaya 15°C sampai -5°C sehingga dapat mengurangi kerusakan struktur yang sensitif. Konsekuensi dari peningkatan laju pembekuan pada proses vitrifikasi adalah penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi untuk meningkatkan viskositas larutan sehingga titik beku larutan

akan menurun lebih cepat sehingga membatasi jumlah kristal es yang terbentuk. Kondisi vitrifikasi membutuhkan penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi yang memungkinkan merusak sel karena stres osmotik atau efek toksik yang ditimbulkan oleh krioprotektan. Salah satu upaya meminimalkan kerusakan tersebut adalah dengan penambahan krioprotektan ekstraseluler dengan konsentrasi yang bertingkat. Sukrosa merupakan jenis krioprotektan ekstraseluler yang sering digunakan pada vitrifikasi oosit sapi maupun embrio. Penambahan sukrosa ke dalam medium ekuilibrase sebelum proses kriopreservasi itu menghasilkan peningkatan viabilitas embrio pasca pencairan kembali. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji efek penambahan sukrosa dengan dua konsentrasi yang berbeda, yaitu 0,65 M dan 0,5 M pada morfologi dan juga persentase hidup oosit pasca vitrifikasi (Widyastuti dkk., 2017).

Kunci utama yang menentukan tingkat keberhasilan vitrifikasi oosit adalah keseimbangan antara laju pendinginan, konsentrasi dan jenis krioprotektan yang digunakan (Bartolac dkk., 2015).

Penggunaan krioprotektan bertujuan melindungi oosit dari penurunan kualitas dan memberi media bagi oosit seperti keadaan lingkungan asli (Wahjuningsih, 2013).

Penelitian yang diperoleh Hartady dkk. (2018) bahwa konsentrasi krioprotektan *Dimethyl Sulfoxide* 17% + etilen glikol 17% yang tinggi dalam larutan vitrifikasi mengurangi kemungkinan kristalisasi intraseluler yang dianggap menyebabkan kerusakan selama proses pembekuan

cepat, tetapi juga dapat menyebabkan efek toksisitas dan stres osmotik pada oosit walaupun tanpa pendingin, persentase oosit yang hidup sebesar 75% (Ridwan, 2020).

Pada medium kultur perlu ditambahkan bahan antioksidan dapat menangkal atau mengurangi terjadinya radikal bebas antara lain ITS, *glutathione sulfhidril* (GSH).

F. Antioksidan GSH

Glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) merupakan tripeptida yang terdiri atas asam amino glisin, asam *glutamate* dan sistein dengan ikatan gamma peptida yang menghubungkan antara gugus amina sistein (yang melekat dengan ikatan peptida pada glisin) dengan gugus karboksil pada rantai samping glutamat. *Glutathion* umumnya disingkat GSH, karena adanya gugus (-SH) yang terdapat pada sistein senyawa tersebut, juga merupakan bagian molekul *glutathion* yang berperan aktif (Yuniastuti, 2016).

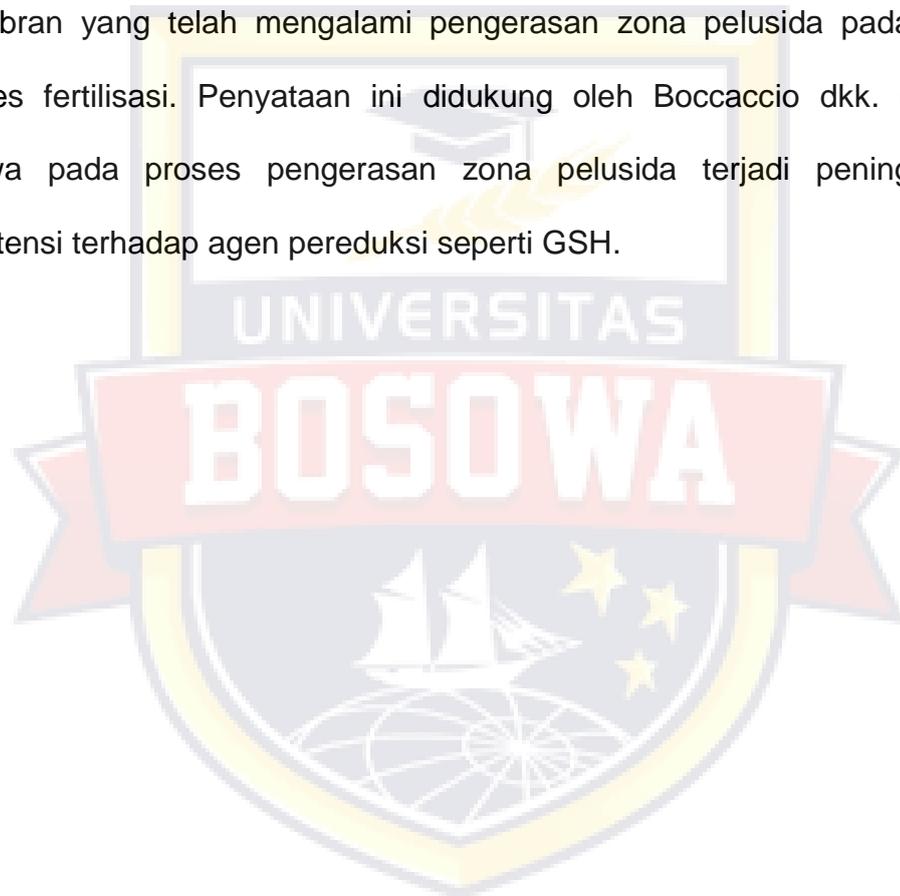
Glutathion (GSH) ditemukan hampir di semua jaringan mamalia dan terutama sangat terkonsentrasi di hati. *Glutathion* dalam tubuh terdapat dua bentuk yaitu dalam bentuk kekurangan thiol, merupakan bentuk *glutathion* tereduksi atau biasa dikenal sebagai *glutathion* (GSH) dan bentuk disulfida-teroksidasi (GSSG). Disulfida teroksidasi (GSSG) merupakan GSH yang aktif menangkap radikal bebas (Heisterkamp dkk., 2008).

Secara alami oosit menghasilkan *glutathione* (GSH) yang dapat mereduksi H_2O_2 sebelum sempat bereaksi dengan unsur logam menjadi radikal bebas (Park dkk., 2014).

Sintesis GSH tergantung pada ketersediaan *cysteine* yang sangat mudah teroksidasi menjadi *cystine* pada lingkungan ekstraseluler. GSH memiliki peran penting dalam pembentukan pronukleus. Lebih lanjut ditunjukkan bahwa terdapat tiga peran GSH dalam meningkatkan pembentukan pronukleus. Peran pertama, GSH mampu berperan sebagai antioksidan dengan menetralkan H_2O_2 dan L-OOH yang dikatalisis oleh enzim *glutathione peroxidases* (GPx). Hal ini diduga bahwa dengan penambahan GSH pada medium fertilisasi, dapat mencukupi kebutuhan antioksidan sehingga ROS dapat dinetralkan dengan baik. Peran kedua, GSH diduga dapat berperan sebagai buffer intraseluler oosit. Selama stres oksidasi, protein thiol seperti *cysteine* dapat dengan mudah teroksidasi menjadi asam sulfenik yang diduga dapat menurunkan pH intraseluler oosit (Lu, 2013).

Hasil penelitian Nugroho dkk. (2017) menunjukkan bahwa tingkat pembelahan embrio pada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T1) sebesar 82,1% dan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T3) sebesar 84,3% lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada kontrol (T0) sebesar 59,0%. Tingkat pembelahan perlakuan penambahan GSH hanya pada medium kultur (T2) sebesar 57,1% tidak berbeda ($P > 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol

(T0). Hasil tersebut menunjukkan penambahan GSH pada medium kultur tidak meningkatkan oosit yang membelah. Banyaknya oosit yang membelah lebih dipengaruhi oleh banyaknya pronukleus normal yang terbentuk akibat penambahan GSH pada medium fertilisasi. Hal tersebut diduga penambahan GSH pada medium kultur tidak dapat masuk melalui membran yang telah mengalami pengerasan zona pelusida pada saat proses fertilisasi. Pernyataan ini didukung oleh Boccaccio dkk. (2012) bahwa pada proses pengerasan zona pelusida terjadi peningkatan resistensi terhadap agen pereduksi seperti GSH.



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2023. Bertempat di Laboratorium Produksi Embrio *In Vitro*, Fakultas Peternakan, Gedung Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Hasanuddin.

B. Alat Dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain ovarium, *alcohol* 70%, tissue, mineral oil (Sigma Chemicalt Co. St. Lous MO, USA), *Glutathion* (GSH), NaCl, aquades, pen-strep (100 IU/ml), phosphate-buffered saline (PBS), FBS/serum, TCM-199, PMSG (10 IU/ml), hCG (10 IU/ml), gentamycin (550 IU/ml), BSA, EG, DMSO, sukrosa, Nitrogen cair.

Alat yang digunakan adalah incubator, mikroskop olympus SZ51, selang infus, scalpel, petri dish, gelas kimia, freezer, pemanas air, timbangan analitik, kaca objek, kaca penutup, pipet, mikropipet, tip mikropipet, straw, cawan petri, pisau bedah, gelas ukur, Spatula Stainlessteel, tabung reaksi, microtube sentrifugasi, tabung sentrifus, glove dan gunting bedah.

C. Prosedur Penelitian

Pembuatan Media

1. Medium Transportasi

9 gram NaCl (Natrium Clorida) + penisilin, streptomysin, aquades hingga mencapai volume akhir 1 liter.

2. Medium Koleksi

48,75 ml phosphate-Buffered Saline (PBS) + 1,25 ml FBS (2,5%).

3. Medium Maturasi

- 1800 μ l TCM-199
- [;200 μ l FBS (10%)
- 20 μ l PMSG/FSH (10 IU/ml)
- 20 μ l hCG (10 IU/ml)
- 4 μ l gentamycin (50 μ g/ml)

Koleksi dan Seleksi Oosit

Ovarium sapi diperoleh dari rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dengan media transport (larutan 0,9% NaCl). Koleksi oosit dilakukan dengan metode slicing. Oosit diseleksi menggunakan mikroskop Olympus SZ51 japan (hanya oosit grade A dan B yang dikoleksi untuk dibekukan).

Maturasi Oosit

Oosit yang telah diseleksi dimatangkan di dalam medium maturasi yang terdiri dari medium TCM 199 (*Gibco by life technologies*, USA) ditambahkan 0,3% FBS, 10 IU/ml *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (*Intergonan, Intervet, Deutschland GmbH*), 10 IU/ml *human Chorionic gonadotrophin* (hCG) (*Chorulon*,

Intervet international BV Boxmeer-Holland), and 50 µg/ml *gentamycin* (Sigma Aldrich, USA).

Maturasi dilakukan dalam bentuk drop (80 µl/drop) dengan jumlah oosit 10-15/drop dan ditutup dengan mineral oil (Sigma Chemicc Co. St. Louis MO, USA). Maturasi dilakukan di inkubator 5% CO₂ dengan temperature 38,5 °C selama 24 jam (Hasbi dkk., 2012).

Vitrifikasi Oosit

Vitrifikasi oosit dilakukan menggunakan sistem sedotan tertutup dengan media vitrifikasi yang mengandung 3% BSA + 15% DMSO + 15% EG + 0,5 M sukrosa. Oosit diseimbangkan dalam medium ekuilibrasi mengandung 3% BSA + 10% EG selama 3-5 menit. Oosit dimasukkan ke dalam 0,25 ml straw (Gunawan dkk., 2021).

Straw diisi dengan sukrosa diikuti dengan ruang udara, media vitrifikasi, ruang udara, kemudian media vitrifikasi yang mengandung oosit, diikuti oleh ruang udara, kemudian sukrosa dan media vitrifikasi. Ujung straw yang terbuka kemudian disegel dan didinginkan terlebih dahulu dalam uap nitrogen cair selama 10 detik dan dimasukkan ke dalam kontainer selama 7 hari.

Thawing Oosit

Oosit dicairkan setelah penyimpanan dalam nitrogen cair. Straw dari nitrogen cair didiamkan pada suhu ruang selama 6 detik

kemudian diletakkan pada *water bath* dengan suhu 37 °C selama 30 detik. Sedotan kemudian dijentikkan perlahan agar larutan yang ada di dalam sedotan tercampur, isi straw dipindahkan ke medium thawing yang mengandung 3% BSA dan sukrosa 0,25 M. Oosit kemudian dipindahkan ke media adaptasi yang mengandung 3% BSA, gentamisin dan *glutathion sulphidryl* (GSH). Setelah pemulihan 30 menit dalam PBS, oosit dinilai untuk kelangsungan hidup. Oosit yang bertahan adalah berbentuk bulat yang tidak lisis, tidak menyusut, bengkak atau menghitam. Oosit yang masih hidup diaktivasi secara genetik dan dikultur secara *in vitro* (Zhou dkk., 2016).

D. Desain Penelitian

Desain penelitian yaitu penambahan *Glutathione* (GSH) pada media adaptasi (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM) dengan waktu 30 menit.

P₀ : Kontrol

P₁ : medium adaptasi dengan penambahan GSH (Glutation) 0,5mM.

P₂ : medium adaptasi dengan penambahan GSH (Glutation) 1mM.

P₃ : medium adaptasi dengan penambahan GSH (Glutation) 1,5mM.

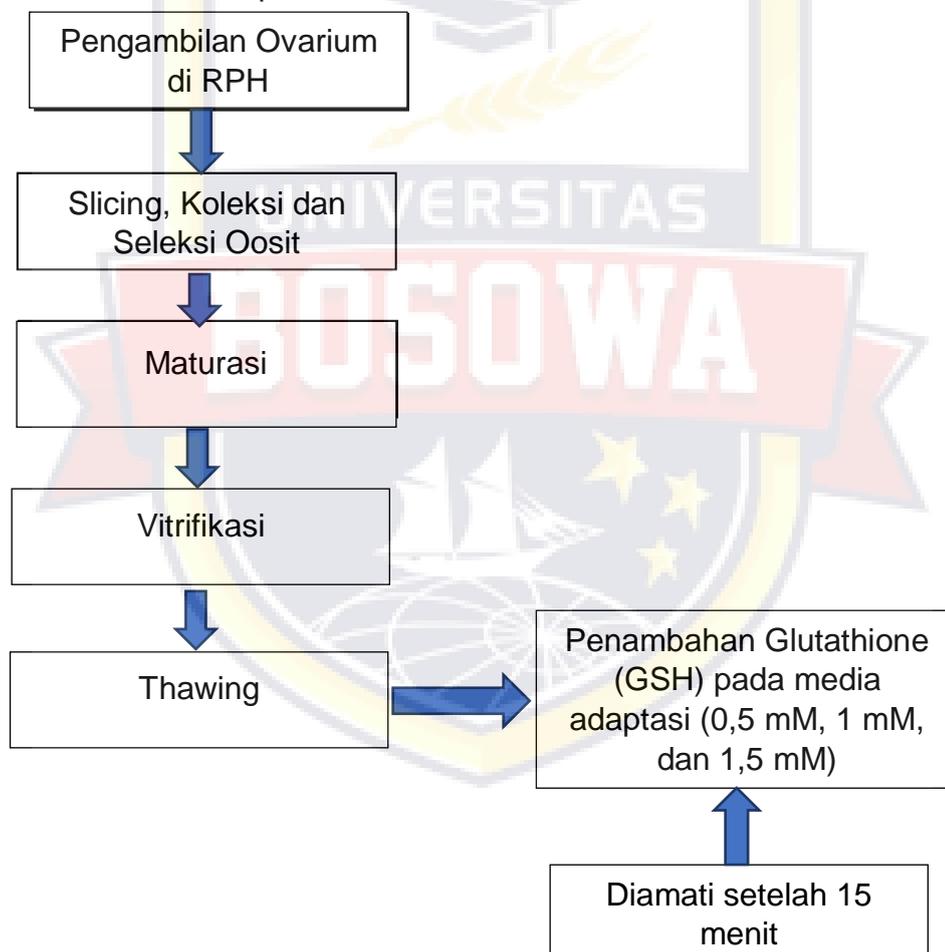
E. Pengamatan dan Analisis Data

Parameter yang diamati adalah morfologi oosit (viabilitas, zona pelusida fraktur, penyusutan, dan lisis) setelah pembekuan dan pencairan kembali.

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan ANNOVA yang terdiri dari 4 perlakuan dan 6 kali ulangan, Jika terdapat perbedaan secara nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji duncan. Pengolahan data menggunakan program software SPSS v16.

Adapun secara rinci prosedur penelitian disajikan pada Gambar 3.

Gambar 3. Prosedur penelitian

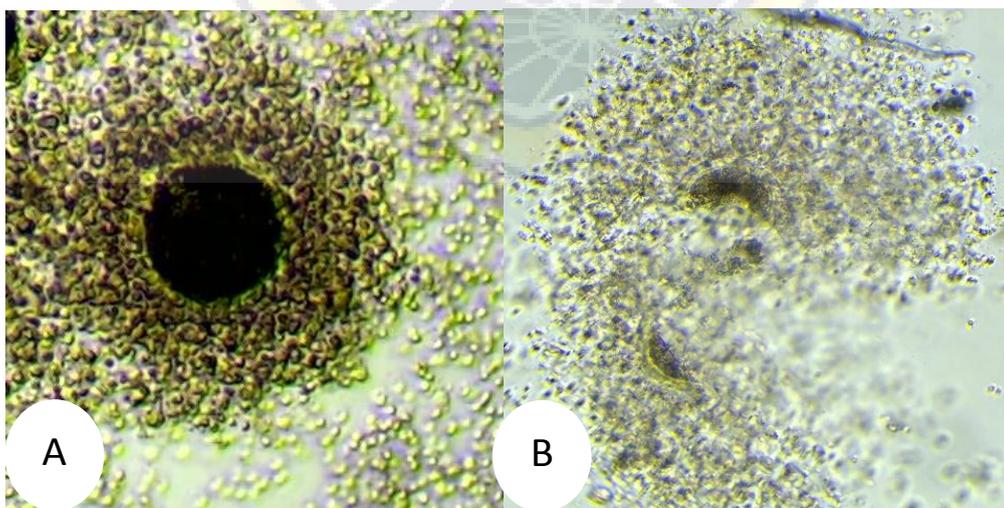


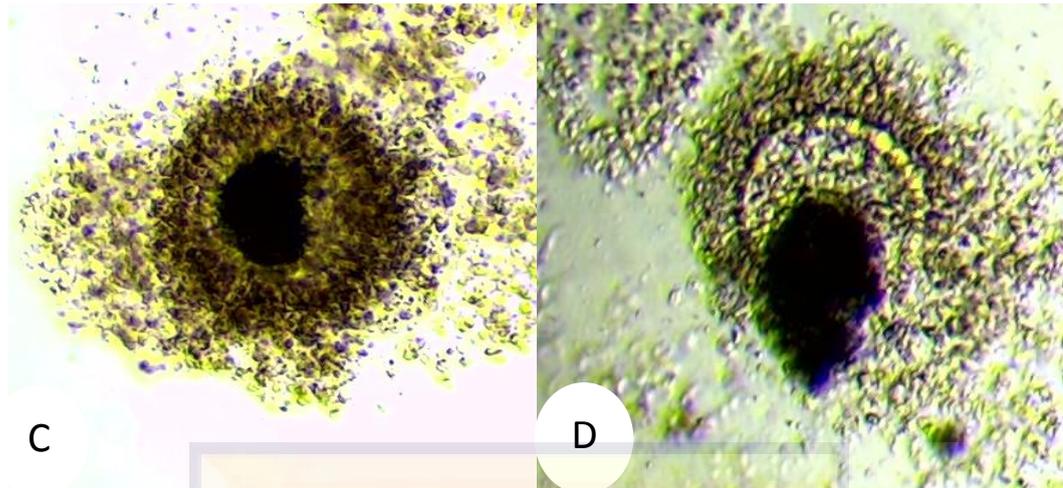
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses *vitrifikasi* oosit dilakukan sebagai upaya penyediaan oosit dalam pelaksanaan fertilisasi *in vitro* (VIF), yang kemudian digunakan dalam program transfer embrio. Penelitian dengan penambahan GSH pada media adaptasi diharapkan dapat menghasilkan oosit sapi Bali yang berkualitas tinggi, yang ditunjukkan dengan keadaan morfologi oosit setelah proses *vitrifikasi* dan *thawing*.

Morfologi oosit setelah pembekuan dan pencairan kembali dapat dilihat dari kondisi zona pelusida dan sitoplasma. Oosit yang hidup (*viabel*) ditandai dengan zona pelusida dan sitoplasma yang utuh setelah pencairan kembali. Oosit yang mati (*tidak viabel*) ditandai dengan keadaan zona pelusida yang fraktur, penyusutan sitoplasma, dan sitoplasma lisis, dapat dilihat pada Gambar 4.





Gambar 4. Oosit Sapi Bali Pascavitrifikasi-Pencairan kembali

Keterangan : A. Oosit yang viabilitas
 B. Oosit dengan zona pelusida fraktur
 C. Oosit dengan penyusutan sitoplasma
 D. Oosit dengan sitoplasma lisis

Hasil observasi parameter oosit viabel dan tidak viabel pasca vitrifikasi-pencairan kembali dapat diamati pada Tabel 1.

Tabel 1. Parameter oosit viabel dan tidak viabel setelah pembekuan pada media adaptasi dengan penambahan (GSH) yang berbeda

Perlakuan	N	Parameter (%)			
		Hidup (Viabel)	Zona Pellusida Fraktur	Penyusutan Sitoplasma	Sitoplasma lisis
P ₀	52	29(57.38±7.39) ^a	3(5.11±8.12) ^a	14(27.02±8.96) ^b	6(12.00±7.69) ^a
P ₁	44	31(73.88±9.28) ^b	0(0.00±0.00) ^a	10(20.00±13.33) ^{ab}	3(6.11±9.52) ^a
P ₂	32	23(75.00±13.94) ^b	1(2.77±6.80) ^a	2(5.55±13.60) ^a	6(16.66±14.90) ^a
P ₃	44	31(72.36±10.21) ^b	0(0.00±0.00) ^a	8(16.52±12.30) ^{ab}	5(11.11±9.74) ^a
Total	168	114(69.65±12.20)	4(1.97±5.40)	32(17.27±13.85)	18(11.47±10.77)

Keterangan : P₀: Kontrol; P₁: 0,05mM; P₂: 1mM; P₃: 1,5mM. Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaa (P<.05)

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh penambahan GSH terhadap: pada viabel P₀, P₁, P₂, dan P₃ berturut-turut 57.38, 73.88, 75.00, dan 72.36 (P<.05), dan penyusutan sitoplasma P₀, P₁, P₂, dan P₃ berturut-turut 27.02, 20.00, 5.55, 16.52 (P<.05). Persentase oosit yang

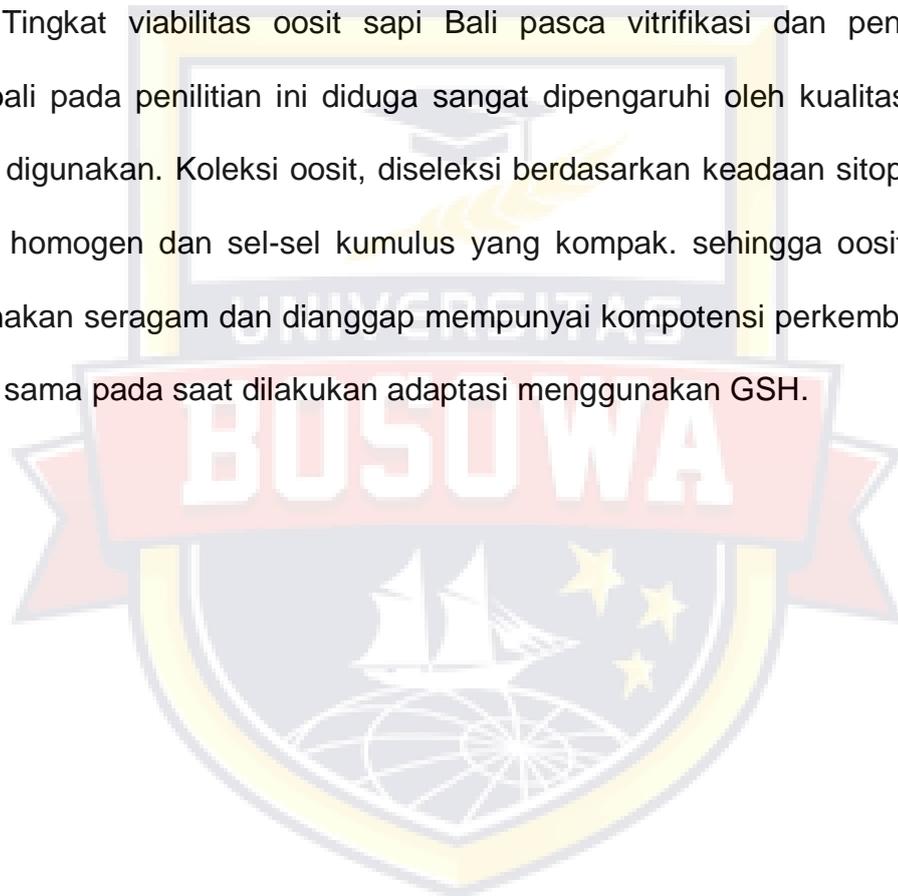
viabel pada perlakuan GSH nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibanding kontrol. Sedangkan penyusutan sitoplasma, perlakuan 1mM (GSH) nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibanding kontrol, 0,5mM dan 1,5mM. Glutathione sulfhidril adalah suatu thiol tripeptida (*γ -glutamylcysteinylglycine*) yang merupakan komponen *sulphydryl* non protein berperan penting dalam detoksifikasi dan antioksidan seperti memelihara kondisi redoks 21 intraseluler dan melawan stress oksidatif (Luberda, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada zona pellusida fraktur (P0, P1, P2 dan P3 berturut-turut 5.11, 0.00, 2.77, 0.00) dan sitoplasma lisis (P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 12.00, 6.11, 16.66, 11.11) tidak menunjukkan pengaruh ($P > .05$). *Glutathione* (GSH) memiliki fungsi, antara lain mempertahankan reaksi redoks pada sel yang dikultur, meningkatkan produksi, protein, DNA, serta menghambat reaksi sulfasi (Kim dkk., 2004).

Sistem antioksidan GSH adalah sistem proteksi endogen yang utama, karena GSH langsung terlibat dan berpartisipasi aktif dalam penghancuran senyawa reaktif oksigen (ROS) dan juga mempertahankan bentuk reduced (aktif) dari vitamin C dan E. *Glutathion* sebagai antioksidan intraseluler (antioksidan dari sel tubuh sendiri), juga disebut sebagai master antioksidan karena GSH mengatur kerja antioksidan lainnya. Sebagai contoh, ketika vitamin C dan E mengambil radikal bebas mereka akan memberikannya kepada glutathion untuk kemudian kembali mengambil yang lainnya. *Glutathion* menetralkan radikal bebas tersebut dan dibuang melalui urin. Daya kerja GSH dalam melindungi sel tubuh dari

radikal bebas jauh lebih baik dari antioksidan lain seperti vitamin C dan E. *Glutathion* akan menjaga rantai DNA dan RNA pada inti sel agar tidak mengalami penguraian dan melindungi inti sel dari radikal bebas, GSH mengikat zat yang tidak diinginkan dan membawanya keluar melalui urin dan empedu (Sugiyanto 2008).

Tingkat viabilitas oosit sapi Bali pasca vitrifikasi dan pencairan kembali pada penelitian ini diduga sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan. Koleksi oosit, diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak. sehingga oosit yang digunakan seragam dan dianggap mempunyai kompetensi perkembangan yang sama pada saat dilakukan adaptasi menggunakan GSH.



BAB V

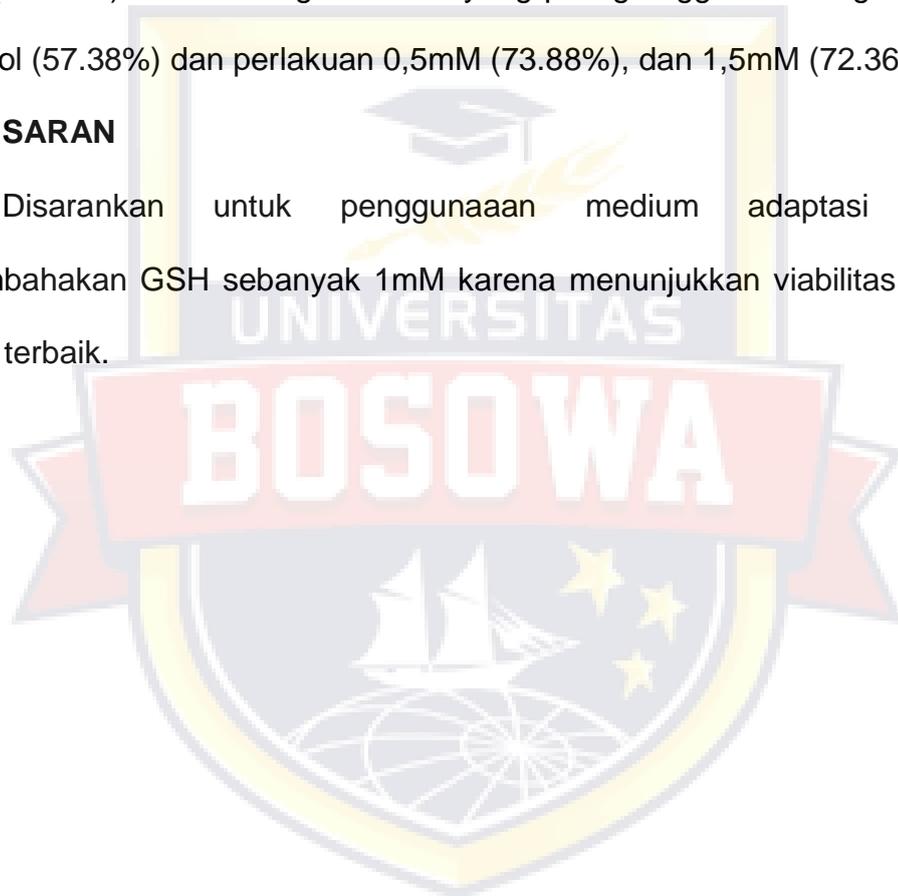
KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Penambahan antioksidan GSH pada media adaptasi menunjukkan 1 mM (75.00%) memiliki tingkat viabel yang paling tinggi dibanding dengan kontrol (57.38%) dan perlakuan 0,5mM (73.88%), dan 1,5mM (72.36%).

B. SARAN

Disarankan untuk penggunaan medium adaptasi perlu ditambahkan GSH sebanyak 1mM karena menunjukkan viabilitas oosit yang terbaik.



DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, P., dan Cholifah. 2018. *Buku ajar biologi reproduksi*. Umsida Press. <https://doi.org/10.21070/2018/978-602-5914-12-6>
- Anwar, R. 2005. *Morfologi Dan Fungsi Ovarium*. Skripsi. Fakultas Kedokteran UNPAD. Bandung.
- Astiti, N. M., Ayu G. R., 2018. Sapi Bali dan pemasarannya. *Warmadewa University*. https://repository.warmadewa.ac.id/461/1/buku%20sapi%20bali%20dan%20pemasarannya_.pdf.
- Bartolac L. M., Lowe J. L., Koustas G., Sjoblom C., Grupen C. G. 2015. *A comparison of different vitrification device and the effect of blastocoel collapse on the cryosurvival of in vitro produced porcine embryos*. *J Reprod Dev*. 61(6): 525-531
- Bintara O. A., Setiadi M. A., Karja N. W. K. 2015. Tingkat maturasi dan fertilisasi oosit domba yang dimaturasi dalam media dengan imbuhan b-mercaptoethanol secara *in vitro*. *j. vet*. 16(4): 585-591.
- Boccaccio A., Frassanito M. C., Lamberti L., Brunelli R., Maulucci G., Monaci M., Papi M., Pappalettere C., Parasassi T., Sylla L., Ursini F., De Spirito M. 2012. *Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine zona pellucida*. *Roy Soc Inter* 1: 1-12.
- Campbell N. A., Jane B. R., Urry L. A., Mitchell L. C., Steven A. W., Peter V. M and Robert B. J. 2010. *Biology*. Erlangga. Jakarta.
- Fausiah, 2014. Pengaruh penambahan antioksidan GSH (*glutathion*) terhadap tingkat pematangan oosit sapi Bali secara *in vitro*. Universitas Hasanuddin.
- Feng G., Shi D., Yang S., Wang X. 2013. *Co-Culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells*. *Zygote*. 21:231-237.
- Firmiati, S., Ciptadi, G., Wahjuningsih, S., Suyadi, S. 2014, Effect of insulin transferin selenium (ITS) on oocyte maturation in vitro in Indonesian goats. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4(7), 113-117. https://www.researchgate.net/publication/261438630_Effect_of_Insulin_Transferin_Selenium_ITS_on_oocyte_maturation_in_vitro_in_Indonesia_n_goats.
- Gunawan M., Pratiwi P. A., Kain E. M., Sjahfirdi L. 2018. *The effect of addition glutathione antioxidant on vitrification medium to the viability of Garut sheep (Ovis aries) oocytes*. *Journal of Physics, 1 Research Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI), Cibinong, Bogor 16911, Indonesia*
- Hasbi, Gustina S., Setiadi M. A., Supriatna, I. 2012. tingkat pematangan inti oosit

- domba dan pembentukan pronukleus setelah parthenogenesis dengan penambahan *glutathione*. *Jurnal Veteriner*, 13(4), 445–452. file:///C:/Users/ASUS/Downloads/6038-1-9853-1-10-20130721.pdf
- Handarini R., Hardiansyah D., dan Sudrajat D. 2014. Kualitas oosit dari ovarium sapi peranakan Ongole (po) pada fase folikuler dan luteal. *jurnal pertanian*, 5, 89.
- Hartady T., Widyastuti R., Syamnunarno A. A. R. M. 2018. Viabilitas oosit domba pasca vitrifikasi menggunakan kombinasi ethilen glikol dan dimetil sulfoksida dengan dua level konsentrasi berbeda. *Jurn ilmu ternak*. Vol. 18 no , 17-21.
- Heisterkamp N., Groffen J., Warburton D., and Snedon T. P. 2008. *The Human gamma-glutamyltransferase gene family*. *Human Genetic* 123(4):321-332
- Hoque S. A. M., Kabiraj S. K., Yahia Khandoker M. A. M., Mondal A., Tareq K. M. A. 2011. *Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes*. *African J Biotechnol*. 10:9177-9181.
- Kakkassery M. P, Anand L. F, Rijaryakumaran V., Srekumaran T. 2010. *In vitro maturation of Bos indicus oocytes: Effect of cumulus oocyte complex morphology*. *Vet Anim Sci*. 6:247-249.
- Kim, M. K., Fibrianto, Y. H., Oh, H. J., Jang, G., Kim, H. J., Lee, K. S., Kang, S. K., Lee, B. C., & Hwang, W. S. (2004). *Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle*. *Journal of Veterinary Science*, 5(3), 253–258.
- Kurniawan S., Handarini R., dan Dihansih E. 2019. *Giving response gnrh hormone, estrogen, progesterone and prostaglandin in estrus synchronization implementation estrous cow recipient friesian holstein*. *jurnal peternakan nusantara*, 4(2), 93–98. <https://doi.org/10.30997/jpnu.v4i2.1540>.
- Liebermann J., Nawroth F., And Isachenko F. 2002. *Potential importance of vitrification in reproductive medicine*. *Biol. Reprod*. 67: 71 – 80.
- Luberda Z. 2005. *The role of glutathione in mamalia gametes*. *Biol Reprod* 5(1):5-17
- Lu SC. 2013. *Glutathione synthesis*. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3143-3153.
- Novitasari E., Pemayun T. G. O., Suatha I. K., dan Trilaksana I. G. N. B. 2022. Tingkat maturasi oosit sapi bali pada media TCM 199 dengan penambahan hipotaurin. *buletin veteriner udayana*, 524. <https://doi.org/10.24843/bulvet.2022.v14.i05.p12>
- Nugroho A. P., Supriatna I., dan Setiadi M. A. 2017. Penambahan *glutathione* pada medium fertilisasi efektif mendukung pembentukan pronukleus dan perkembangan awal embrio sapi (*supplementation of glutathione in fertilization medium effectively support normal pronucleus formation and*

early bovine embryonic de. *jurnal veteriner*, 18(3), 327.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.3.327>.

- Nurchahyo H., Ciptono. 2013. Maturasi oosit dan fertilisasi in vitro menggunakan kultur sel granulosa folikel ovarium. Laporan Tahunan Hibah Bersaing. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Palmerini M.G., Nottola S.A., Leoni G.G., Succu S., Borshi X., Berlinguer F., Naitana S., *Bekmukhambetov, Y., Macchiarelli, G.* 2014. *In vitro maturation is slowed in prepubertal lamb oocytes: ultrastructural evidences. reprod. biol. endocrinol.* 24(12): 115.
- Park S. H., Cho H. S., Yu I. J. 2014. *Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of in vitroproduced blastocysts. Reprod Dom Anim* 1: 1-8.
- Pamungkas, F. A. 2010. Pemanfaatan metode vitrifikasi untuk kriopreservasi oosit mamalia. *wartazoa*, 20(3), 112.
- Pranatasari D., Kustono K., dan Widayati, D. T. 2016. Suplementasi hormon gonadotropin pada medium maturasi in vitro untuk meningkatkan perkembangan embrio stadium 4 sel kambing bligon. *buletin peternakan*, 40(2), 83. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v40i2.9080>.
- Prastowo S., Amin A., Rings F., Held E., Wondim D.S., Gad A., Neuhoff C., Tholen E., Looft C., Schellander K., Tesfaye D., Hoelker M. 2016. *Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the amp-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. reprod. fertil. dev.* 29: 890-905.
- Pusfita A. 2017. Kemampuan perkembangan embrio sapi bali hasil kriopreservasi dengan penggunaan krioprotektan etilen glikol [thesis (skripsi)]. Universitas Hasanuddin.
- Rafli F., Tethool A. N., dan Pattiselanno F. 2018. Pengamatan pendahuluan ovarium bandikut (*echymipera kalubu*). *jurnal ilmu peternakan dan veteriner tropis (journal of tropical animal and veterinary science)*, 8(2), 83. <https://doi.org/10.30862/jipvet.v8i2.35>.
- Rahma N., Udin Z., dan Masrizal M. 2020. Pengaruh waktu penyimpanan ovarium terhadap kuantitas dan kualitas oosit serta tingkat maturasi oosit secara in vitro pada sapi simental. *jurnal peternakan indonesia (indonesian journal of animal science)*, 22(3), 346. <https://doi.org/10.25077/jpi.22.3.346-352.2020>.
- Ridwan N. A. 2020. Tingkat fertilisasi oosit sapi Bali yang dibekukan menggunakan krioprotektan berbeda [thesis (skripsi-s1), universitas hasanuddin]. <http://repository.unhas.ac.id/id/eprint/2573>.

- Silvia R. 2015. *In Vitro Maturation (IVM) of Human Oocytes: Promising Potential, Challenges and Chances for Improvement*. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(2). <https://doi.org/10.25077/jka.v4i2.305>.
- Suparman E., dan Suparman E. 2016. Peran GnRH agonis. *JURNAL BIOMEDIK (JBM)*, 8(1). <https://doi.org/10.35790/jbm.8.1.2016.12329>.
- Sugiyanta. 2008. Peran glutathione sebagai master antioksidan. *Biomedis*;1(1):48-53.
- Wahjuningsih S., Djati S. 2013. Ultrastruktur oosit kambing pasca kriopreservasi dengan metode vitrifikasi. *j.kedokteran hewan*. vol. 7 no. 2, 101-104
- Widyastuti R., Khoirinaya C., Ridlo M. R., dan Syamsunarno M. R. A. A. 2017. Perbandingan viabilitas oosit pascavitrifikasi pada dua tingkat konsentrasi sukrosa yang berbeda. *majalah kedokteran bandung*, 49(4), 252–258. <https://doi.org/10.15395/mkb.v49n4.1139>.
- Widyastuti R., Setiawan R., dan Rasad S. D. 2015. Perbandingan tingkat kematangan inti oosit sapi pasca maturasi in vitro dengan penambahan serum buatan 10 % dan *fetal bovine serum 10 %*.
- Yuniastuti A. 2016. Dasar molekuler glutathione dan perannya sebagai antioksidan. Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam universitas negeri semarang.
- Zhou C. J., Wu S. N., Shen J. P., Wang D. H., Kong X. W., Lu A., Li Y. J., Zhou H. X., Zhao Y. F., Liang C. G. 2016. *The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice*. *PeerJ*. 4:e1761. <https://doi.org/10.7717/peerj.1661>.

LAMPIRAN 1

a. Analisis oosit Viabel

Between-Subjects Factors

	N
Penambahan GSH pada media adaptasi P0	6
P1	6
P2	6
P3	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Viabel

Penambahan GSH pada media adaptasi	Mean	Std. Deviation	N
P0	57.3850	7.38762	6
P1	73.8883	9.28795	6
P2	75.0017	13.94234	6
P3	72.3617	10.21150	6
Total	69.6592	12.20095	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viabel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1226.321 ^a	3	408.774	3.720	.028
Intercept	116457.588	1	116457.588	1.060E3	.000
Perlakuan	1226.321	3	408.774	3.720	.028
Error	2197.533	20	109.877		
Total	119881.442	24			
Corrected Total	3423.854	23			

a. R Squared = .358 (Adjusted R Squared = .262)

Homogeneous test

Viabel

Penambahan GSH pada media adaptasi		N	Subset	
			1	2
Duncan ^a	P0	6	57.3850	
	P3	6		72.3617
	P1	6		73.8883
	P2	6		75.0017
	Sig.		1.000	.685

b. Oosit Zona Pellusida Fraktur

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Zona_Pellusida_Fraktur

Penambahan GSH pada media adaptasi	Mean	Std. Deviation	N
P0	5.1133	8.12263	6
P1	.0000	.00000	6
P2	2.7783	6.80550	6
P3	.0000	.00000	6
Total	1.9729	5.40223	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Zona_Pellusida_Fraktur

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	109.774 ^a	3	36.591	1.303	.301
Intercept	93.418	1	93.418	3.328	.083
Perlakuan	109.774	3	36.591	1.303	.301
Error	561.459	20	28.073		
Total	764.651	24			

Corrected Total	671.234	23		
-----------------	---------	----	--	--

a. R Squared = .164 (Adjusted R Squared = .038)

c. Oosit yang mengalami Penyusutan Sitoplasma

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Penyusutan_Sitoplasma

Penambahan GSH pada media adaptasi	Mean	Std. Deviation	N
P0	27.0200	8.96372	6
P1	20.0017	13.33300	6
P2	5.5550	13.60692	6
P3	16.5283	12.30873	6
Total	17.2762	13.85601	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Penyusutan_Sitoplasma

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1441.894 ^a	3	480.631	3.232	.044
Intercept	7163.252	1	7163.252	48.175	.000
Perlakuan	1441.894	3	480.631	3.232	.044
Error	2973.851	20	148.693		
Total	11578.996	24			
Corrected Total	4415.745	23			

a. R Squared = .327 (Adjusted R Squared = .226)

Homogeneous test

Penyusutan_Sitoplasma

Penambahan GSH pada media adaptasi	N	Subset	
		1	2
Duncan ^a P2	6	5.5550	
P3	6	16.5283	16.5283

P1	6	20.0017	20.0017
P0	6		27.0200
Sig.		.065	.173

d. Oosit yang mengalami Sitoplasma lisis

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Sitoplasma_Lisis

Penambahan GSH pada media adaptasi	Mean	Std. Deviation	N
P0	11.9983	7.68922	6
P1	6.1117	9.52653	6
P2	16.6667	14.90563	6
P3	11.1117	9.74242	6
Total	11.4721	10.77760	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sitoplasma_Lisis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	336.748 ^a	3	112.249	.962	.430
Intercept	3158.609	1	3158.609	27.056	.000
Perlakuan	336.748	3	112.249	.962	.430
Error	2334.858	20	116.743		
Total	5830.214	24			
Corrected Total	2671.606	23			

a. R Squared = .126 (Adjusted R Squared = -.005)

LAMPIRAN 2

a. Ovarium



b. Proses Slacing PENCECAHAN



c. Proses Seleksi Dan Koleksi



d. Pembuatan Media Maturasi



e. Proses Pemasukan Oosit Ke Dalam Inkubator



f. Proses Vitrifikasi



g. Proses Pemasukan Strow Oosit Ke Kontainer



h. Proses thawing



RIWAYAT HIDUP



Penulis Tesis ini bernama Andi Megawati, lahir di Tolada pada tanggal 01 februari 2001. Putri ke-5 dari pasangan bapak Andi Saini dan Sitti Hadia. Penulis berkebangsaan Indonesia dan beragama Islam.

Adapun riwayat pendidikan penulis, yaitu pada tahun 2007 masuk sekolah dasar di SD Negeri 139 Tolada, dan selesai pada tahun 2013, kemudian melanjutkan pendidikan Madrasah Tsanawiyah di MTS Nurul Hikma Tolada, selesai pada tahun 2016 dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 11 Luwu Utara, selesai pada tahun 2019. Saya melanjutkan pendidikan disalah satu perguruan tinggi tepatnya di Universitas Bosowa Makassar pada tahun 2019 dan diterima di Fakultas Pertanian, Jurusan Peternakan, dan Alhamdulillah selesai tahun 2023.

Pengalaman yang didapat selama menumpuh pendidikan adalah sebagai sekertaris umum di Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) Universitas Bosowa pada tahun 2022/2023.

Berkat petunjuk dan pertolongan Allah SWT, usaha dan disertai doa dan kedua orang tua dalam menjalani aktivitas akademik di perguruan Tinggi Universitas Bosowa Makassar. Alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan skripsi yang berjudul “Kualitas Oosit Sapi Bali Setelah Pembekuan dengan Penambahan Glutathion Sulfhidril (GSH) pada Media Adaptasi”.