

**PENGARUH PENAMBAHAN ANTIOKSIDAN *GLUTATHIONE SULFIHIDRIL*
(GSH) PADA MEDIA MATURASI TERHADAP KUALITAS OOSIT
SAPI BALI PASCA KRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

TAUFIK HIDAYAT
45 19 035 010



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BOSOWA
MAKASSAR
2023**

**PENGARUH PENAMBAHAN ANTIOKSIDAN *GLUTATHIONE SULFIHIDRIL*
(GSH) PADA MEDIA MATURASI TERHADAP KUALITAS OOSIT
SAPI BALI PASCA KRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

TAUFIK HIDAYAT
45 19 035 010

BOSOWA

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

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BOSOWA
MAKASSAR**

2023

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengaruh penambahan antioksidan *glutation sulfhidril* (GSH) pada media maturasi terhadap kualitas oosit sapi Bali pasca kriopreservasi.

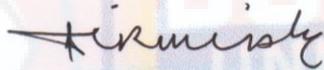
Nama : Taufik Hidayat

Stambuk : 45 19 035 010

Program Studi : Peternakan

Fakultas : Pertanian

Telah diperiksa dan disetujui oleh :



Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP.
Pembimbing I



Dr. Ir. Syarifuddin, S.Pt. MP.
Pembimbing II

Mengetahui,



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



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

Tanggal Lulus : 07 September 2023

PERNYATAAN KEORISINILAN SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Taufik Hidayat

Stambuk : 45 19 035 010

Program Studi : Peternakan

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "Pengaruh Penambahan Antioksidan *Glutation Sulfhidril* (GSH) pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi". 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, 7 September 2023



Taufik Hidayat

RINGKASAN

Pengaruh Penambahan Antioksidan *Glutation Sulfhidril* (GSH) Pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi (di bawah bimbingan Sri Firmiaty sebagai pembimbing utama dan Syarifuddin sebagai pembimbing anggota).

Proses kriopreservasi oosit dilakukan sebagai upaya penyediaan oosit berkualitas dalam pelaksanaan *in vitro* fertilisasi (VIF) yang selanjutnya digunakan untuk program transfer embryo. Sebelum oosit dibekukan oosit perlu dimaturasi terlebih dahulu dalam proses kultur oosit dapat 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 *Glutation sulfhidril* (GSH) dalam media adaptasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh Penambahan GSH Pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi.

Penelitian dilaksanakan bulan Maret-Mei 2023, menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan penambahan *glutathion sulfhidryl* (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 kriopreservasi 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 viabilitas P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 53,86^a, 66,62^b, 69,30^b, dan 73,33^b (P<0.05), Persentase oosit yang viabilitas pada kontrol (tampa GSH) nyata lebih rendah (P<0,05) dibanding perlakuan. Glutathione adalah suatu *thiol tripeptida* (*γ-glutamylcysteinylglycine*) merupakan komponen sulphhydryl non protein yang mempunyai peranan penting dalam detoksifikasi dan antioksidan seperti memelihara kondisi redoks intraseluler dan melawan stress oksidatif. Adapun pada zona pelusida fraktur (P0, P1, P2, dan, P3 berturut-turut 3,33^a, 0,00^a, 0,00^a, 1,38^a), penyusutan sitoplasma (P0, P1, P2, dan P3 berturut-turut 26,13^a, 24,68^a, 17,64^a, dan 20,83^a), dan sitoplasma lisis (P0, P1, P2, dan, P3 berturut-turut 16,66^a, 8,69^a, 13,05^a, 4,44^a) tidak menunjukkan pengaruh (P>0.05). walaupun tidak berpengaruh nyata presentase oosit paling tinggi terdapat di P0. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan GSH pada media maturasi menunjukkan oosit yang hidup lebih banyak jumlahnya dibanding dengan tidak menggunakan GSH pada variabel zona pelusida fraktur, penyusutan sitoplasma, dan sitoplasma lisis. Hal ini disebabkan karena GSH dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas dengan memberikan elektron dan mengubahnya menjadi bentuk yang tidak berbahaya. Disimpulkan bahwa Kualitas oosit menunjukkan peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi GSH 0,5 mM, 1 mM, dan, 1,5 mM yaitu masing-masing 66,62%, 69,30%, dan 73,33%.

Kata Kunci : oosit, sapi Bali, kualitas, kriopreservasi, antioksidan

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang Maha Kuasa karena atas Berkah dan Rahmat-Nya, penulis dapat menyusun skripsi ini dengan judul “Pengaruh Penambahan Antioksidan *Glutathione Sulfhidril* (GSH) pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi.” yang telah dilaksanakan di Laboratorium Produksi Embryo In Vitro, Gedung Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Hasanuddin. Shalawat dan taslim tak lupa dihanturkan untuk Rasulullah Muhammad SAW sebagai Rahmatanlilalamin bagi umat manusia.

Melalui kesempatan ini dengan kerendahan hati perkenankan penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, serta ucapan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Bosowa serta jajarannya.
2. Dekan Fakultas Pertanian serta jajarannya.
3. Ketua Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian serta jajarannya.
4. Ibu Dr. Ir. Sri Firmiaty, MP sebagai pembimbing utama dan Dr. Ir. Syarifuddin, S.Pt, MP sebagai pembimbing anggota. dengan ketulusan hati telah membimbing, memberikan petunjuk dan masukan-masukan yang sangat berguna bagi peneliti selama penelitian sampai selesainya penulisan skripsi ini.

5. Bpk Ir. Muhammad Idrus, MP dan bapak Ahmad Muchlis, S. Pt, M. Si, selaku penguji yang banyak memberikan masukan dan wawasan pengetahuan ilmu peternakan.
6. Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DEA. DES, selaku Kepala Laboratorium Produksi Embryo *in Vitro* Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan ide dan gagasan serta memberikan izin untuk bergabung dalam penelitian ini.
7. Dr. Erni Damayanti S.Pt, MP. yang telah mengajarkan teknik mengkultur oosit sapi Bali secara *in vitro* dan membantu penulis dalam penelitian ini.
8. Pada kedua orang tua, ayahanda Sukiman dan ibunda Wahdania tercinta, Adik-adikku Tercinta Fitra dan Alike Rafanda, serta keluarga besarku yang terus mendidik dan mendukung baik materil maupun moril, dan atas segala limpahan doa, kasih sayang, kesabaran, pengorbanan, dan segala bentuk motivasi yang telah diberikan tanpa henti kepada penulis.
9. Dg Nompo dan semua staf rumah potong hewan Antang Makassar yang telah membantu dalam pengambilan sampel ovarium selama penelitian.
10. Teman penelitian saudara Kana Ary, Andi Megawati, dan Armitha Pratiwi yang telah sama-sama berjuang menyelesaikan penelitian ini.

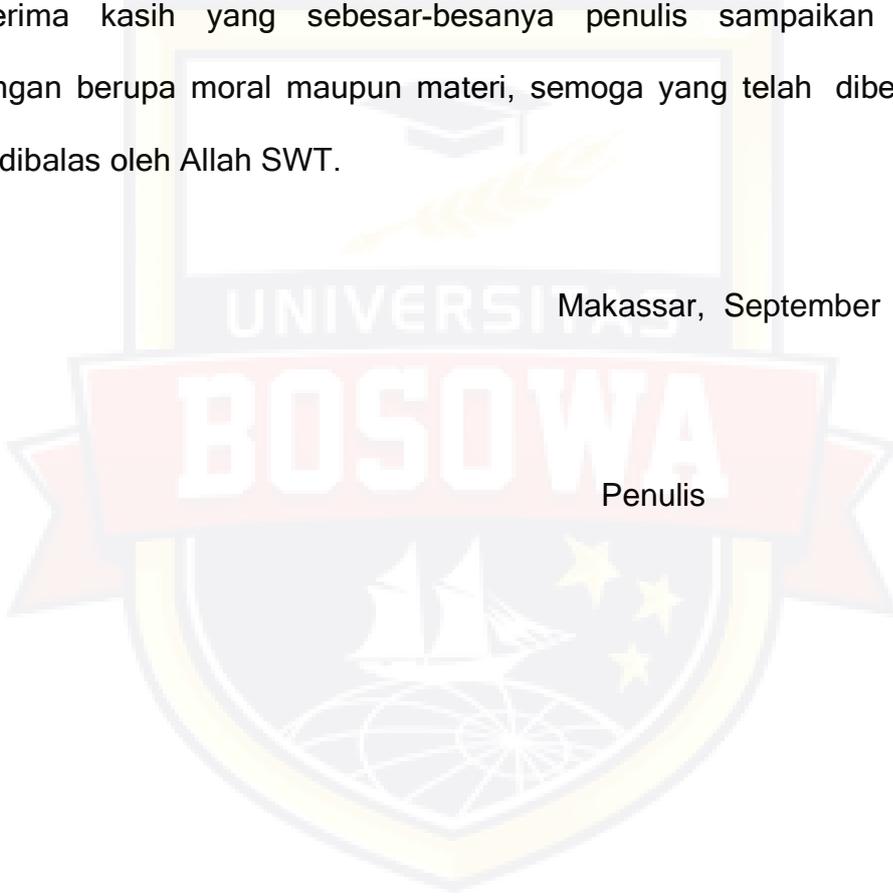
11. Teman-teman seperjuangan Peternakan Angkatan 2019 atas dukungan, bantuan, dan sarannya.

12. Keluarga Besar Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) sebagai wadah membina talenta kepemimpinan penulis.

13. Semua pihak yang tidak dapat penulis tuliskan satu persatu.

Terima kasih yang sebesar-besanya penulis sampaikan atas dukungan berupa moral maupun materi, semoga yang telah diberikan akan dibalas oleh Allah SWT.

Makassar, September 2023



UNIVERSITAS
BOSOWA
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEORSINILAN SKRIPSI	iii
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
C. Manfaat Penelitian.....	3
D. Hipotesis	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tinjauan Umum Sapi Bali	5
B. Ovarium Secara Umum	6
C. Folikulogenesis dan Oogenesis	7
D. Pematangan Oosit in vitro	10
E. Antioksidan <i>Glutation</i>	15
F. Kriopresevasi dan Vitrifikasi.....	17
 BAB III METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
B. Alat dan Bahan	20
C. Rancangan Penelitian	20
D. Prosedur Penelitian	21

E. Parameter yang diamati	24
F. Analisis Data	24

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas Oosit Pasca Kriopreservasi	25
---	----

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	29
B. Saran.....	29

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR		Halaman
	<i>Teks</i>	
1.	Proses Pembelahan Meiosis pada Oosit.....	10
2.	Kualitas Oosit.....	22
3.	Oosit Pasca Kriopreservasi.....	25



DAFTAR TABEL

TABEL	Teks	Halaman
1.	Pengamatan pasca kriopreservasi oosit sapi Bali	26



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Peningkatan kebutuhan protein hewani yang berasal dari ternak yang terus meningkat setiap tahun sumbangan terbesar terhadap konsumsi protein hewani berasal dari daging. Permintaan daging yang terus meningkat menyebabkan terjadi pemotongan sapi betina. Pemotongan betina produktif dalam negeri sudah tidak dapat dihindarkan lagi.

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut yaitu dengan memanfaatkan teknologi maturasi *in vitro*. Ketersediaan sapi Bali betina produktif yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Tamangapa Makassar memungkinkan untuk pemanfaatan ovarium, yang biasanya dibuang namun masih mempunyai oosit yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan mentah dalam proses *in Vitro Maturation* (IVM) dan untuk meningkatkan nilai tambah oosit dilakukanlah metode kriopreservasi. Teknik kriopreservasi oosit merupakan suatu cara untuk menyimpan sampel dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin dan mempertahankan kelangsungan hidup sel. Aplikasi kriopreservasi dalam bidang peternakan termasuk pelestarian strain dengan nilai genetik tinggi, rekayasa genetik maupun spesies yang terancam punah (endangered spesies) sehingga mengurangi biaya peternakan, menghindari masalah genetik dan wabah penyakit (Hartoyo, 2019). Sebelum Kriopreservasi oosit perlu dimaturasi *in vitro*.

Maturasi oosit *in vitro* adalah pematangan oosit pada medium di luar tubuh dan dikultur secara *in vitro*. Melalui tehnik pematangan *in vitro* dimungkinkan untuk diperoleh oosit matang dalam jumlah besar dengan cara menanam telur yang belum diovulasikan dalam medium pematangan (Syamsuddin, 2017). Pada proses maturasi *in vitro* diperlukan media pematangan yang mampu mensupport perkembangan oosit imature menjadi oosit mature yang siap untuk fertilisasi dan dapat berkembang ke tahap *blastosist*. Keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro* sangat tergantung pada beberapa faktor antara lain yaitu jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro*, kualitas oosit yang digunakan, dan resiko kontaminasi serta kondisi kultur (Widyastuti dkk., 2015). Suplemen yang ditambahkan umumnya berupa antioksidan antaralain vitamin E, *Insulin Transferrin Selenium* (ITS), dan *glutathione*.

Penambahan insulin transferrin selenium (ITS) ke dalam medium maturasi oosit kambing efektif meningkatkan kematangan inti sel oosit pada IVM (Firmiatiy, dkk., 2014).

Glutathione (GSH) mempunyai peranan yang penting dalam pematangan oosit. Proses dari pematangan sitoplasma oosit melibatkan sejumlah peristiwa molekuler, termasuk dalam sintesis komponen-komponen biokimia, protein *phosphorilasi* dan pengaktifan lintasan-lintasan metabolisme tertentu. Fungsi GSH (*Glutathione*) didalam oosit sebagian besar berhubungan dengan *antioksidan* dan perlindungan terhadap aktivitas ROS yang toksik (Triwulaningsi dkk., 2002). *Reactive*

oxygen species (ROS) seperti radikal bebas. Radikal bebas merupakan kelompok molekul kimia yang tidak stabil dan sangat reaktif dengan 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*. Radikal bebas dalam keadaan normal mempunyai peran positif dalam fungsi fisiologis yaitu membantu dalam proses *proliferasi* dan diferensiasi sel, tetapi keberadaannya dalam jumlah berlebihan dapat menimbulkan efek negatif, maka dari itu untuk menghambat pembentukan radikal bebas dibutuhkan antioksidan seperti *glutathione* (Fausiah, 2014). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan penambahan GSH dalam medium maturasi lebih optimal meningkatkan jumlah oosit yang teraktivasi (Hasbi dkk., 2012)

Berdasarkan uraian tersebut maka dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan antioksidan GSH (*glutathione*) pada media maturasi terhadap ku alitas oosit sapi Bali pasca kriopreservasi.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh Penambahan GSH pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang bioteknologi reproduksi dan salah satu upaya untuk meningkatkan populasi ternak sapi melalui produksi oosit beku berkualitas yang dapat digunakan untuk pembuatan embrio beku.
2. Sumber informasi bagi mahasiswa, peneliti, dosen dan instansi terkait tentang pemanfaatan *antioksidan* GSH pada media maturasi oosit sebagai upaya meningkatkan kualitas oosit pada Sapi Bali Pasca *Kriopreservasi*.

D. Hipotesis

Diduga bahwa penambahan antioksidan GSH pada media maturasi oosit dapat meningkatkan kualitas oosit pada sapi Bali pasca kriopreservasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Sapi Bali

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) merupakan sapi asli Indonesia yang diketahui mempunyai keunggulan-keunggulan dan disukai oleh petani peternak. Sapi ini merupakan salah satu bangsa sapi potong asli Indonesia yang banyak mendapat perhatian dari berbagai pihak karena memiliki sifat unggul dibanding dengan sapi lainnya (Syarifuddin, 2022).

Sapi Bali memiliki banyak keunggulan yaitu cepat berkembang biak, tingkat kesuburannya/fertilitasnya tinggi, mudah beradaptasi dengan lingkungannya, dapat hidup di lahan kritis, mempunyai daya cerna yang baik terhadap pakan dan persentase karkas yang tinggi. Kemampuan lain yang dapat diandalkan untuk pengembangan populasi sapi Bali adalah interval kelahiran yang cukup baik (Suharyati dan Hartono, 2017).

Sapi Bali telah lama dipelihara oleh masyarakat dan dapat berkembangbiak pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Sapi Bali betina, beranak pertama kali pada umur tiga tahun dan tingkat fertilitas sapi Bali secara *genetic*, tergolong tinggi yaitu 83% dan dengan manajemen *breeding* yang tepat, memungkinkan untuk mencapai efisiensi reproduksi yang tinggi, yaitu setiap induk menghasilkan satu anak pada setiap selang satu tahun. Namun potensi fertilitas ini hanya dapat dicapai bahkan ditingkatkan dengan sentuhan teknologi reproduksi ternak serta jika

faktor ternak dan pengelolaan faktor-faktor lingkungan mendukung pengekspresian potensi tersebut (Sawo, 2017). Organ reproduksi sapi Bali betina terdiri dari organ reproduksi primer dan saluran reproduksi. Organ reproduksi primer adalah ovarium

B. Ovarium

Ovarium merupakan organ reproduksi utama pada ternak betina. Bentuk dan ukuran ovarium berbeda-beda berdasarkan spesies hewan, umur, dan status reproduksi struktur yang berada didalamnya, pada sapi ovarium berbentuk oval dan bervariasi dalam ukuran, panjang dan lebar. Ovarium sapi terbagi atas dua yaitu ovarium kiri dan ovarium kanan. Ovarium kanan dan kiri memiliki perbedaan aktivitas (Ridwan, 2020).

Ovarium ini dapat menghasilkan hormon *steroid* yang berguna dalam proses kebuntingan. Saat terjadi kebuntingan ternak, ovarium mengalami perkembangan dan perubahan morfologis. Ovarium terdiri atas berbagai sistem yang terorganisir yang terdiri atas oosit dan sel *somatik*. Organ ini yang terintegrasi dalam proses maturasi oosit, ovulasi dan pembentuk *corpus luteum* (Syaiful, 2021).

Ovarium terdiri dari dua bagian *medulla* dan *korteks*, bagian *medulla* terdiri dari jaringan ikat *fib roelastik* yang tidak teratur, sistem saraf dan pembuluh darah yang masuk ke dalam ovarium melalui hilus. Sedangkan pada bagian korteks terdapat folikel pada berbagai tahap perkembangan sel telur dan produksi hormon (Fauziah 2014).

Sel gamet pada betina dinamakan ovum. Ovum mengandung *deutoplasma* atau *yolk* yaitu cadangan makanan yang terdiri dari butiran-butiran lemak, karbohidrat dan protein. Ovum dilapisi tiga macam selaput pelindung yaitu selaput primer dihasilkan oleh ovum itu sendiri disebut *membran vitteline*, selaput sekunder pada mamalia disebut zona *pellusida* yang dihasilkan oleh oosit dan selsel folikel dan selaput *tersier* yang terbentuk setelah pembuahan dihasilkan oleh kelenjar-kelenjar saluran kelamin betina (Syamsuddin, 2017).

Kinerja reproduksi sapi betina sangat berhubungan dengan status ovarium, karena ovarium selain berfungsi menghasilkan sel kelamin betina juga menghasilkan hormon-hormon reproduksi yang mempengaruhi kinerja reproduksi. Umur dan berat badan ternak betina dalam proses pertumbuhan menjadi sangat penting peranannya terhadap kinerja reproduksi sapi betina (Hamdani dkk., 2012).

C. Folikulogenesis dan Oogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses pematangan folikel pada korteks ovarium yang mencakup beberapa proses yaitu *rekrutmen*, seleksi, pertumbuhan, pematangan dan ovulasi. Peran utama pematangan folikel adalah untuk menghasilkan sejumlah oosit melalui proses oogenesis (Ridwan, 2020).

Proses pertumbuhan folikel, ovulasi dan pembentukan CL sangat dipengaruhi oleh sirkulasi hormon reproduksi dalam tubuh. *Gonadotrophin*

releasing hormone (GnRH) yang dihasilkan oleh *hypothalamus* berfungsi menstimulasi pengeluaran *folicle stimulating hormone (FSH)* dan *luteinizing hormone (LH)* oleh *hipofisa anterior* sebagai respons terhadap estrogen atau progesteron. Ketika proses pertumbuhan folikel kecil (*Recruitment*) berlangsung, mRNA meningkat. Pada saat seleksi morfologis, folikel dominan mengandung estrogen dengan konsentrasi tinggi dalam cairan folikel dan segera setelah proses seleksi berakhir, maka folikel dominan banyak mengandung mRNA untuk reseptor *gonadotrophin dan hormon steroid* (Mutmainna, 2014).

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).

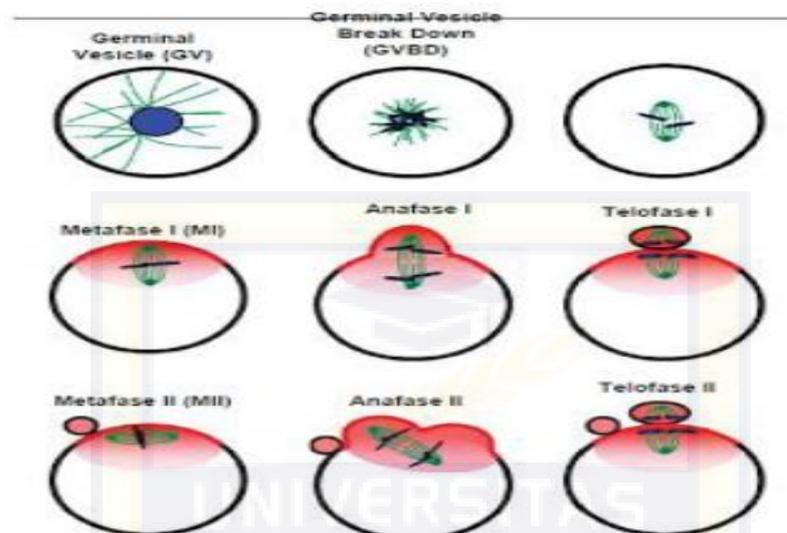
Pengelompokan folikel berdasarkan ukuran diameternya terbagi menjadi tiga kelompok yaitu dilakukan oleh tiga kelompok folikel tersebut adalah folikel ukuran kecil (2-3 mm), folikel ukuran sedang (3,1–5 mm), folikel ukuran besar (>5 mm) (Syamsuddin, 2017).

Oogenesis adalah suatu proses pembentukan, pertumbuhan dan pematangan dari gamet betina. Dimulai sejak embrional sampai setelah dilahirkan dan mencapai puncaknya pada saat *ovulasi* (Mutmainna, 2014).

Proses oogenesis terdiri dari beberapa tahap yaitu *oogonium* mengalami pembelahan mitosis berubah menjadi oosit primer. Oosit primer melakukan meiosis (tahap I), yang menghasilkan dua sel anak yang ukurannya tidak sama. Sel anak yang lebih besar adalah oosit sekunder yang bersifat *haploid* (n). Ukurannya lebih besar dari yang lain karena berisi lebih banyak sitoplasma dari oosit primer yang lain. Sel anak yang lebih kecil disebut badan kutub (*polar body*) pertama yang kemudian membelah lagi (Ridwan, 2020).

Tahap pembelahan meiosis yang pertama disebut *Germinal Vesicle* (GV) yang ditandai dengan adanya membran inti yang utuh dan *nucleus* yang jelas. membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk *Germinal Vesicle* (GV) dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD). Setelah GVBD terjadi, kromosom dibungkus oleh *mikrotubulus* dan *mikrofilamen* yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap metaphase I (MI). Pada oosit sapi, metaphase I terjadi setelah 12-14 jam inkubasi dan diikuti oleh tahap anaphase (AI) dan telophase (TI) yang berlangsung relatif singkat (14-18 jam) setelah masa inkubasi. Tahap metaphase II (MII) akan terjadi dan ditandai dengan terbentuknya

badan kutub I dan oosit yang sudah matang siap untuk difertilisasi (Syamsuddin, 2017).



Gambar 1. Proses Pembelahan Meiosis pada Oosit (Syamsuddin, 2017).

Ovum atau gamet hasil oogenesis mengandung semua materi yang diperlukan untuk *metabolism*, inisiasi, untuk perkembangan awal embrio. Oleh karena itu *oogenesis* selain memproduksi *nucleus haploid* juga memproduksi sejumlah simpanan protein dan enzim *sitoplasma*, mRNA, *organel*, dan *substrak metabolic* (Harmiatusun, 2017).

D. Pematangan *in Vitro*

Pematangan oosit *in vitro* adalah pematangan oosit pada medium di luar tubuh dan dikultur secara *in vitro*. Melalui tehnik pematangan *in vitro* dimungkinkan untuk memperoleh oosit matang dalam jumlah besardengan cara menanam telur yang belum diovulasikan dalam medium pematangan. Pematangan oosit primer dapat berkembang menjadi oosit sekunder yang akan melakukan proses pembelahan meiosis dengan

normal dan sempurna sehingga menghasilkan sel telur yang siap untuk dibuahi. Lima faktor yang sangat berkompeten dalam keberhasilan pematangan oosit adalah morfologi kumulus, ukuran dan kesehatan folikel, stimulasi ovarium dan prosedur pematangan oosit dari sebelum mulai diinkubasi (Syamsuddin, 2017) .

Oosit akan mengalami proses maturasi secara spontan dengan adanya media yang sesuai menurut (Mutmainna, 2014), bahwa Proses pematangan oosit memerlukan medium yang berfungsi sebagai tempat penyediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit. Zat nutrisi yang diperlukan harus selektif dan mempunyai konsentrasi yang sesuai, serta memiliki pH, susunan gas dan *osmolaritas* larutan *fisiologis*. pH harus dijaga tetap sekitar 7,2 dan 7,4, sedangkan osmolaritas ialah ukuran konsentrasi partikel terlarut dalam suatu larutan (osm/L).

Kualitas oosit yang belum dimatangkan dilihat berdasarkan penilaian visual dari kekompakan dan banyaknya sel cumulus yang mengelilingi oosit. Proses maturasi meliputi pematangan nucleus serta sitoplasma oosit. Proses maturasi oosit primer perlu dilakukan sebelum terjadinya proses fertilisasi *in vitro* oleh spermatoa dengan tujuan untuk mempertinggi tingkat keberhasilan fertilisasi (Wahjuningsih dan Djati, 2013).

Sel-sel kumulus berperan penting dalam proses pematangan oosit secara *in vitro*, yang selanjutnya juga akan mempengaruhi kualitas embrio

yang dihasilkan. Apa bila sel-sel kumulus dilepaskan sebelum maturasi, maka akan terjadi kelambatan dalam proses pematangan oosit atau bahkan tidak terjadi pematangan. Kehadiran sel-sel kumulus sangat berperan penting dalam proses transkripsi dan sintesis protein sebelum terjadinya *germinal vesicle breakdown* (GVBD) pada oosit sapi dan domba. Oosit yang memiliki sel-sel kumulus menunjukkan perkembangan yang lebih baik dibandingkan dengan oosit yang telah dihilangkan sel kumulusnya terlebih dahulu (Fauziah, 2014).

Pada proses maturasi *in vitro* diperlukan media pematangan yang mampu mensupport perkembangan oosit *imature* menjadi oosit matur yang siap untuk fertilisasi dan dapat berkembang ke tahap *blastosist*. Keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro* sangat tergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro*, kualitas oosit yang digunakan, serta resiko kontaminasi dan kondisi kultur (Widyastuti dkk., 2015).

Perkembangan teknologi *in vitro maturation* (IVM) dan *in vitro fertilization* (IVF) yang baik akan menyediakan satu pendekatan untuk usaha penyelamatan materi genetik bagi hewan dengan genetik unggul atau hewan hampir punah yang mati tiba-tiba. Namun demikian, usaha tersebut memerlukan teknik koleksi dan preservasi yang tepat karena prosedur yang digunakan untuk memproses ovarium dan oosit yang ada di dalamnya dapat mempengaruhi tingkat maturasi dan perkembangan embrio selanjutnya. Oosit yang terdapat di dalam folikel harus

dipertahankan viabilitasnya sampai dapat dikoleksi dan ditempatkan pada kondisi kultur yang sesuai. Jika oosit *intra-ovarian* ini mampu dipertahankan viabilitasnya selama periode tertentu sehingga dapat mendukung keberhasilan IVM/IVF, maka prosedur tersebut memberi kemungkinan untuk digunakan dalam menyelamatkan materi genetik atau gen dari hewan post-mortem (Muhajir dkk., 2018).

Pada proses pematangan oosit secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya medium dan lingkungan penyimpanan (*incubator*) medium maturasi tidak hanya berpengaruh terhadap proses pematangan tetapi berpengaruh juga terhadap pembuahan dan perkembangan embrio. Oleh karena itu berbagai metode pematangan oosit telah diaplikasikan dengan penambahan berbagai hormon serta aplikasi system kultur pada medium (Fauziah, 2014).

Medium yang digunakan untuk pematangan oosit dapat memberikan pengaruh tidak hanya untuk proses pematangan oosit tetapi juga untuk perkembangan embrio. Berdasarkan komposisi bahan penyusunan medium yang 12 biasa digunakan untuk proses produksi embrio *in vitro* dapat dibedakan menjadi medium sederhana seperti *whitten* medium, *brinster* medium, *whitten* dan *biggers*, *human tubal fluid* (HTF), *chatot ziomex and bavister* (CZB), dan *potassium* (Hartoyo, 2019).

Hormon gonadotropin merupakan regulator utama untuk pematangan inti oosit hewan mamalia secara *in vitro estradiol* mungkin terlibat dalam

pematangan sitoplasma dengan menstimulasi DNA *polymerase* dan diduga meningkatkan sintesis faktor pertumbuhan pronukleus jantan. Dengan adanya *estradiol* pada pematangan oosit dapat meningkatkan produksi *blastosit* secara nyata. Penambahan hormon GnRH dalam medium maturasi dapat meningkatkan kualitas oosit dan kemampuan perkembangan dengan perubahan proses *metabolism* (Ridwan, 2020).

Perproduksi embrio secara *in vitro* biasanya menggunakan media yang berbeda untuk mendukung perkembangan oosit dan embrio agar mampu berkembang mencapai tahap blastosis. Media yang bisa digunakan dibedakan menjadi media kompleks dan media sederhana. Medium kompleks merupakan medium yang mengandung asam-asam amino, asam nukleat, vitamin, serta ion-ion penting lainnya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan oosit dan embrio *in vitro*. Media sederhana adalah media yang memiliki komposisi bahan penyusun yang terdiri dari larutan fisiologis dan mengandung garam-garam anorganik dan natrium *bikarbonat* sebagai penyangga *piruvat* (Karja dkk., 2019).

Komponen media kultur yang paling krusial adalah penambahan serum. Selama ini, serum yang digunakan sebagai suplementasi untuk media kultur pada maturasi *in vitro* adalah *Bovine Serum Albumine* (BSA), *Fetal Calf Bovine Serum* (FBS) dan *Newborn Calf Bovine Serum* (NCBS). Semua jenis serum tersebut merupakan hasil dari industri dan harganya relatif mahal (Widyastuti dkk., 2015). Beberapa bahan digunakan dalam medium kultur antara lain antioksidan yaitu *glutathion*.

E. Antioksidan Glutathione

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) merupakan tripeptide 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*. *Glutathione* umumnya disingkat GSH, karena adanya gugus *sulfhidril* (-SH) yang terdapat pada sistein senyawa tersebut, juga merupakan bagian molekul *glutathione* yang berperan aktif (Yuniastuti, 2016).

Glutathione (C₁₀H₁₇N₃O₆S) dan derivatnya yang merupakan *tripeptida* (γ -Glu-Cys-Gly) dapat mempengaruhi banyak aspek metabolisme, diantaranya membantu detoksifikasi dan transport dari γ -glutamyl-amino acid. *Glutathione* adalah antioksidan primer yang bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai dampak negative (Triwulanningsih dkk., 2003).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan ROS, berupa radikal bebas. Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Glutathione adalah antioksidan berperan sangat penting dalam melindungi sel, berfungsi dalam dalam pembentukan, pembelahan, proliferasi dan mempertahankan sel limfosit T

yang merupakan mekanisme terdepan pertahanan terhadap infeksi (Yuniastuti, 2016).

Penambahan *glutathione* sebagai antioksidan sebesar 0,75 mM–1,0 mM cenderung dapat mencegah terjadinya radikal bebas dan membantu mengurangi kadar racun dan kontaminasi jasad renik serta meningkatkan kualitas medium fertilisasi dan meningkatkan kemampuan spermatozoa melakukan penetrasi pada sel telur, sehingga menghasilkan persentase pembelahan oosit, walau tidak berbeda nyata antar perlakuan (Triwulaningsi dkk., 2002).

Glutathione aktif di dalam fungsi oosit, termasuk dalam memelihara morfologi *meiotik spindel*. *Glutathione* melindungi spindel terhadap kerusakan oksidatif dan berperan dalam mendukung pembentukan zigot yang normal. Konsentrasi GSH (*Glutathione*) didalam oosit meningkat selama proses metaphase II (MII). Secara umum konsentrasi GSH (*Glutathione*) di dalam oosit-oosit yang diovulasikan (MII) adalah kira-kira dua kali lebih tinggi dibandingkan di dalam oosit pada tahap germinal vesicle (GV). Dalam oosit hamster konsentrasi GSH dari 1,0 pmol/oosit pada tahap GV menjadi 1,62 oosit pada tahap MII (Fauziah, 2014).

Penambahan GSH mungkin memberikan pengaruh yang positif pada pematangan sitoplasma sehingga bisa mendukung pembentukan pronukleus. Penambahan GSH hanya pada medium kultur hasilnya baik, karena penambahan GSH saat kultur mungkin membuat kondisi kultur

lebih baik sehingga jumlah pronukleus yang terbentuk lebih banyak (Hasbi dkk., 2012).

Penambahan *glutathione* sebanyak 0,5 mM ke dalam pengencer Tris sitrat buffer cukup efektif memperbaiki kondisi membran plasma semen cair yang disimpan pada suhu 5°C, sehingga dapat meningkatkan persentase motilitas, persentase hidup, keutuhan membran dan tudung akrosom utuh (Triwulanningsih dkk., 2003).

F. Kriopreservasi dan vitrivikasi

Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa atau oosit ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Apabila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum deep freezing maupun dehidrasi pada saat pencairan kembali (*thawing*) menjadi perhatian khusus (Ridwan, 2020).

Kriopreservasi pada oosit kurang populer apabila dibanding dengan kriopreservasi pada sperma maupun embrio. Kriopreservasi oosit lebih sulit dilakukan karena luas permukaan oosit lebih besar dibanding dengan volume sitoplasmanya. Selain itu, oosit juga lebih sensitif terhadap proses pendinginan. Kesulitan lainnya adalah oosit hanya mempunyai satu sel sehingga apabila bagian sel tersebut rusak maka proses perkembangan

akan terhenti. Kondisi ini sangat berbeda dari embrio yang telah memiliki banyak sel sehingga apabila ada satu sel yang rusak masih ada kemungkinan sel lain untuk berkembang ke tahapan selanjutnya. Oosit beku akan memiliki nilai tambah yang cukup tinggi apabila setelah proses pencairan kembali masih memiliki morfologi dan struktur organel yang normal. Nilai tambah yang cukup tinggi ini karena struktur organel sangat penting dalam menunjang dan menjalankan aktivitas biologis oosit pada saat fertilisasi dan proses perkembangan menjadi embrio (Widyastuti dkk, 2018).

Vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang semakin populer dalam bidang reproduksi untuk memecahkan berbagai masalah biologis baik dasar maupun terapan melalui proses kriopreservasi yang lebih sederhana daripada metode pembekuan konvensional. Secara umum proses vitrifikasi meliputi: 1) *dehidrasi* yaitu proses terjadinya pengeluaran cairan sitoplasma yang digantikan oleh larutan krioprotektan melalui proses difusi ke dalam sel, 2) *cooling* yaitu tahap saat oosit dan larutan berbeda dalam nitrogen cair membentuk solid glass, 3) *warming* yaitu tahap terjadi perubahan kembali bentuk larutan menjadi cair, serta 4) *rehidrasi* yaitu proses masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan (Pamungkas, 2010).

Bagi dunia peternakan dan kedokteran hewan diperlukan suatu metode yang praktis dan aplikatif di lapangan, sehingga metode vitrifikasi dapat menjadi suatu alternatif. Proses *kriopreservasi* yang dilakukan

menjadi lebih efisien, lebih sederhana, dan lebih murah karena tidak diperlukan waktu yang lama dalam prosedur pembekuannya, disamping tidak menggunakan peralatan mahal seperti pada metode metode pembekuan yang telah dilakukan sebelum-nya. Secara teknis, metode ini dapat memperkecil kerusakan sel embrio akibat kristal es ekstraseluler, telah dilakukan pengamatan terhadap embrio dari beberapa spesies, metode vitrifikasi dapat mengurangi kerusakan akibat pembekuan karena suhu kritis dapat dilampaui dengan sangat cepat (Rimayanti, 2005).



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2023, bertempat di Laboratorium produksi Emryo In Vitro, Gedung Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Hasanuddin.

B. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan adalah ovarium sapi Bali yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Tamangapa, alcohol 70 %, mineral oil (Sigma Chemical Co. St. *Louis MO*, USA), glutation, NaCL, aquadest, pen-strip (100 IU/ml), phospat-buffered saline (PBS), FBS/serum, TCM-199, PMSG, hCG, gentamycin, BSA, EG, DMSO, sukrosa, nitrogen cair.

Alat yang digunakan adalah *incubator*, mikroskop Olympus SZ51, selang infus, scalpel, petri dish, gelas kimia, I abu *enlemeyer*, *freezer*, pemanas air, timbangan analitik, kaca objek, kaca penutup, pipet tetes, *mikropipet*, cawan petri dan gunting bedah, straw, pisau bedah, gelas ukur, spatula stainlesssteel, tabung reaksi, microtube sentrifugasi, tabung sentrifus, glove, tissue dan gunting bedah.

C. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan dengan susunan sebagai berikut :

P0: Kontrol

P1: Medium maturasi dengan Penambahan GSH (*Glutathione*) 0,5 mM.

P2: Medium maturasi dengan Penambahan GSH (*Glutathione*) 1 mM.

P3: Medium maturasi dengan Penambahan GSH (*Glutathione*) 1,5 mM.

Oosit setelah maturasi selama 24 jam akan dilanjutkan dengan proses kriopreservasi.

D. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media

Medium Transportasi

9 gram NaCl (*Natrium Clorida*) + aquadest hingga mencapai volume akhir 1 liter, kemudian ditambahkan 500 µl penisilin streptomisin (pen-strep) (100 IU/ml).

Medium Koleksi

48,75 ml *phosphate-Buffered Saline* (PBS) + 1,25 ml FBS/*serum* (2,5%) + µl penisilin streptomisin (100 IU/ml).

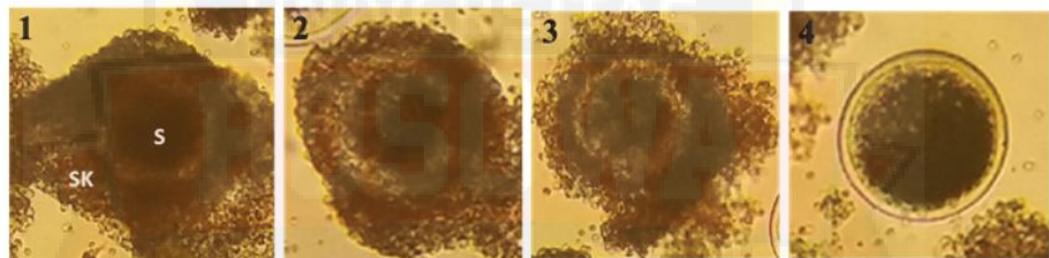
Medium Maturasi

- 1800 µl larutan TCM-199
- 200 µl *serum*/FBS (10%)
- 20 µl FSH (10 IU/ml)
- 20 µl hCG (10 IU/ml)
- 4 µl *gentamycin* (50 µg/ml)

2. 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*. Selanjutnya oosit diseleksi menggunakan mikroskop *Olympus SZ51* japan (hanya oosit grade A dan B yang dikoleksi untuk dimaturasi). Oosit grade A dan B ditandai dengan beberapa lapis sel cumulus yang kompak serta sitoplasma yang terlihat homogen.

Gambar 2. Kualitas oosit



Sumber : (Gustina dkk., 2017)

Keterangan :

Oosit 1 : grade A

Oosit 2 : grade B

Oosit 3 : grade C

Oosit 4 : grade D

SK : Sel Kumulus

S : Sitoplasma

3. Pematangan *in vitro*.

Oosit yang telah diseleksi dan telah melalui dua kali pencucian dengan beberapa media dimatangkan di dalam medium maturase,

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

4. Kriopreservasi dan *Thawing*

Oosit yang telah matang dan kemudian dikriopreservasi dengan metode vitrifikasi. 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. Setelah kesetimbangan, oosit dimasukkan ke dalam 0,25 ml straw.

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

Setelah kriopreservasi oosit dicairkan setelah penyimpanan dalam nitrogen cair. Straw diambil dari nitrogen cair didiamkan pada suhu kamar selama 6 detik kemudian direndam dalam pemanas air pada 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 dan

gentamisin. Setelah pemulihan 30 menit dalam media adaptasi, oosit dipindahkan ke dalam PBS untuk dinilai kelangsungan hidupnya. Oosit yang bertahan adalah yang bentuknya teratur, bulat yang tidak lisis, menyusut, bengkak atau menghitam. Oosit yang masih hidup diaktivasi secara genetik dan dikultur secara *in vitro* (Zhou dkk., 2016).

E. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati adalah morfologi oosit (viabilitas, zona pelusida fraktur, penyusutan sitoplasma, sitoplasma lisis) pasca *kriopreservasi* dan pencairan kembali.

F. Analisis Data

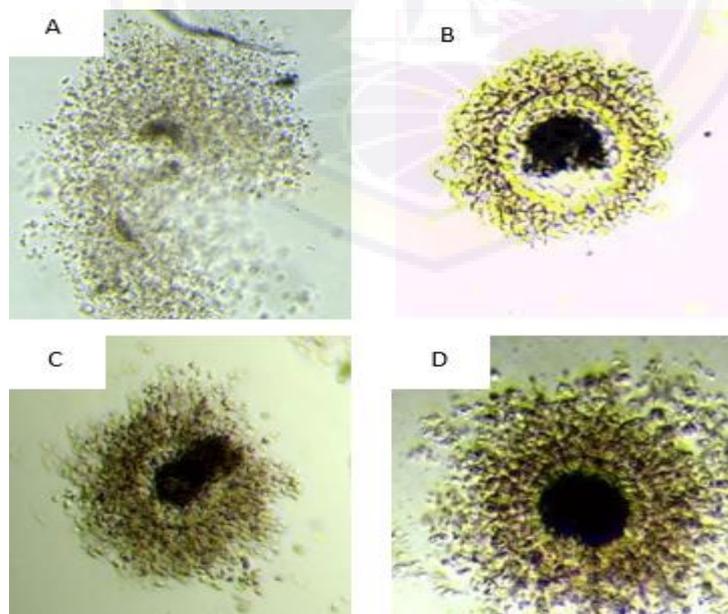
Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ANNOVA yang terdiri dari 4 perlakuan dan 6 kali ulangan. Jika terdapat perbedaan secara nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Pengolahan data menggunakan program SPSS. v. 16.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses kriopreservasi oosit dilakukan sebagai upaya penyediaan oosit dalam pelaksanaan in vitro fertilisasi (VIF) yang selanjutnya digunakan untuk program transfer embryo. Penelitian penambah GSH pada media maturasi diharapkan dapat menyediakan oosit sapi Bali yang berkualitas yang dilihat dari kondisi morfologi oosit setelah proses kriopreservasi dan pencairan kembali (*thawing*).

Kondisi morfologi oosit pasca pencairan kembali dapat dilihat dari kondisi zona pelusida dan sitoplasma. Oosit yang mati ditandai dengan keadaan zona pelusida yang fraktur dan pengerutan sitoplasma ataupun sitoplasma yang lisis. Oosit yang hidup (*viabilitas*) ditandai dengan zona pelusida dan sitoplasma yang utuh setelah pencairan kembali.



Gambar 3. Oosit Pasca Kriopreservasi

Keterangan :

- A. Oosit dengan zona pelusida fraktur
- B. Oosit dengan penyusutan sitoplasma
- C. Oosit dengan sitoplasmayang lisis (A-C oosit yang mati).
- D. Oosit yang bertahan hidup

Hasil observasi persentase oosit pasca vitrifikasi dan pencairan

kembali dapat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan pasca kriopreservasi oosit sapi Bali

Perlakuan	N	Parameter (%)			
		Hidup (Viabilitas) N (%±SD)	Zona Pellusida Fraktur N (%±SD)	Penyusutan Sitoplasma N (%±SD)	Sitoplasma lisis N (%±SD)
P0	39	22 (53.86±10.78) ^a	1 (3.33±8.16) ^a	11 (26.13±15.82) ^a	5 (16.66±26.58) ^a
P1	33	20 (66.62±8.72) ^b	0 (0.00±0.00) ^a	9 (24.68±8.67) ^a	4 (8.69±11.16) ^a
P2	38	26 (69.30±9.86) ^b	0 (0.00±0.00) ^a	7 (17.64±17.38) ^a	5 (13.05±10.56) ^a
P3	44	32 (73.33±8.16) ^b	1 (1.38±3.40) ^a	8 (20.83±10.20) ^a	3 (4.44±7.57) ^a
Total	154	100 (65.78±11.52)	2 (1.18±4.35)	35 (22.32±13.06)	17 (10.71±15.47)

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaa ($P < 0.05$).

Data Hasil penelitian setelah dianalisis menunjukkan bahwa pada variabel viabilitas berpengaruh nyata ($P < 0,05$), Viabilitas oosit pada kontrol (tanpa GSH) nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibanding dengan perlakuan 0,5mM, 1mM dan 1,5Mm tetapi antara perlakuan 0,5mM, 1mM dan 1,5Mm tidak berbeda nyata. Konsentrasi GSH sebanyak 1,5 mM menunjukkan yang terbaik dari segi viabilitas 73,33% disajikan pada Thabel 1, hal ini disebabkan karena gluthatione adalah suatu *thiol tripeptida* (*γ-glutamylcysteinylglycine*) merupakan komponen sulphhydryl

non protein yang mempunyai peranan penting dalam detoksifikasi dan antioksidan seperti memelihara kondisi redoks intraseluler dan melawan stress oksidatif yang terdapat dalam dua bentuk yaitu untuk mereduksi (GSH) dan bentuk mengoksidasi (GSSG) (Luberda, 2005).

Gluthatione juga berperan dalam memelihara morfologi meiotik spindel, melindungi spindel terhadap kerusakan oksidatif dan mendukung pembentukan zigot yang normal. Meiotik spindel merupakan komponen sel yang tidak terlibat langsung dalam proses metabolisme, tetapi berperan sangat penting dalam proses pematangan inti dan pematangan sitoplasma (Zuelke dkk., 1997).

Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa pada variabel zona pelusida fraktur, penyusutan sitoplasma, dan sitoplasma lisis tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$), tetapi walaupun tidak berpengaruh nyata presentase oosit yang mengalami zona pelusida fraktur, penyusutan sitoplasma, dan sitoplasma lisis paling tinggi terdapat di P0 disajikan pada Tabel 1. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan GSH pada media maturasi menunjukkan oosit yang hidup lebih banyak jumlahnya dibanding dengan tidak menggunakan GSH pada variabel zona pelusida fraktur, penyusutan sitoplasma, dan sitoplasma lisis. Hal ini disebabkan karena GSH dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas dengan memberikan elektron dan mengubahnya menjadi bentuk yang tidak berbahaya. GSH juga dapat meregenerasi antioksidan lain, seperti vitamin C dan vitamin E, sehingga meningkatkan efisiensi sistem

antioksidan (Luberda, 2005). Meskipun antara perlakuan tidak memiliki perbedaan secara nyata ($P>0,05$).

Hasil secara keseluruhan menunjukkan bahwa penggunaan GSH pada media maturasi memberikan hasil yang lebih baik dibanding dengan tidak menggunakan GSH pada media maturasi. Hal ini terlihat pada tingkat viabilitas oosit yang nyata lebih tinggi pada penambahan GSH pada media maturasi sebelum dikriopreservasi dibanding dengan tidak menggunakan GSH, yaitu secara berurutan P0 53,86%, P1 66,62%, P2 69,30% dan P3 73,33% ($P<0,05$). Hasil serupa dengan penelitian Gunawan (2021) menunjukkan hasil yang sama yaitu dengan konsentrasi GSH 1,5 mM memiliki presentasi oosit yang viabilitas lebih tinggi dan seiring meningkatnya konsentrasi GSH menunjukkan kecenderungan peningkatan presentase oosit yang viabilitas pada oosit domba Garut pasca kriopreservasi dan pencairan kembali.

Tingkat viabilitas oosit pasca kriopreservasi juga sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan. Pada penelitian ini oosit yang digunakan diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak, sehingga oosit yang digunakan diusahakan seragam dan dianggap mempunyai kompetensi perkembangan yang sama.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Penambahan antioksidan *glutathione* pada media maturasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap viabilitas oosit tetapi pada variabel lain tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Kualitas oosit menunjukkan peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi GSH 0,5 mM, 1 mM, dan 1,5 mM yaitu masing-masing 66,62%, 69,30%, dan 73,33%.

B. Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut penambahan antioksidan GSH dengan konsentrasi yang lebih tinggi dengan harapan akan dapat diperoleh viabilitas oosit yang lebih banyak setelah proses kriopreservasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Fauziah, A. 2014. *Penambahan Antioksidan Gsh (Glutathione) Terhadap Tingkat Pematangan Oosit Sapi Bali Secara in Vitro* [Universitas Hasanuddin]. <http://digilib.unhas.ac.id/opac/detail-opac?id=10763>
- Firmiatiy, 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_Indonesian_goats
- Guawan. 2021. Pengaruh penambahan antioksidan glutathione pada medium maturasi oosit domba Garut (*ovis aries*) terhadap kualitas oosit pascavitrifikasi. *Conference Series*. <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20493836&lokasi=lokal>
- Gustina, S., Hasbi, H., Kurniani Karja, N. W., & Setiadi, M. A. 2017. Kualitas Oosit Kerbau dari Status Reproduksi Ovarium yang Berlainan. In *Jurnal Sain Veteriner* (Vol. 35, Issue 2, p. 216). <https://doi.org/10.22146/jsv.34695>
- Hamdani, M. D. I., Ismaya, I., & Kustono, K. 2012. Hubungan Antara Berat Badan Sapi Betina Peranakan Ongole dan Sapi Persilangan pada Tingkatan Umur yang Berbeda terhadap Ukuran dan Karakteristik Ovarium. *Buletin Peternakan*, 32(2), 91. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v32i2.1248>
- Harmiati, Y. 2017. Oogenesis dan Spermatogenesis Pada Mamalia. *Majalah Kedokteran FK UKI*, 25(2), 77–85. <https://doi.org/10.33541/mkvol34iss2pp60>
- Hartoyo, F. R. 2019. *Uji Kriopreservasi Telur Terhadap Keberhasilan Fertilisasi Ikan Lele Dengan Menggunakan DmsO Dan Sukrosa*. <http://repository.ub.ac.id/id/eprint/177493/>
- 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>
- Karja, N. W. K., Nanda, S., & Setiadi, M. A. 2019. Efektifitas Penambahan Insulin dalam Media Maturasi dan atau Media Kultur pada Tingkat Maturasi Oosit dan Perkembangan Awal Embrio Sapi secara In Vitro. *Jurnal Sain Veteriner*, 37(2), 135. <https://doi.org/10.22146/jsv.35565>
- Luberda, Z. 2005. The role of glutathione in mamalia gametes. *Biol Reprod* 5(1):5-17

- Muhajir, M., Karja, N. W. K., Setiadi, M. A., & Adnyane, I. K. M. 2018. Kompetensi Maturasi Oosit in vitro dan Kajian Histologi Folikel dari Ovarium Domba Pascapenyimpanan pada Suhu 4°C. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 6(2), 16–23. <https://doi.org/10.29244/avi.6.2.16-23>
- Mutmainna, A. 2014. *Potensi Oosit Berdasarkan Status Aktivitas* [Universitas hasanuddin]. <https://core.ac.uk/download/pdf/25495887.pdf>
- Pamungkas, F. A. 2010. *Pemanfaatan Metode Vitrifikasi Untuk Kriopreservasi*. 20(3), 112–118. [http://repository.pertanian.go.id/bitstream/handle/123456789/4855/The Use of Vitrification Method For Cryopreservation of Mammalian Oocyte.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repository.pertanian.go.id/bitstream/handle/123456789/4855/The%20Use%20of%20Vitrification%20Method%20For%20Cryopreservation%20of%20Mammalian%20Oocyte.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Pusfita, A. 2017. Kemampuan perkembangan embrio sapi bali hasil kriopreservasi dengan penggunaan krioprotektan etilen glikol [Universitas Hasanuddin]. In *Skripsi thesis, FaPet Universitas Hasanuddin*. <https://core.ac.uk/download/pdf/89565742.pdf>
- Ridwan, N. A. 2020. Tingkat Fertilitas Oosit Sapi Bali Yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Berbeda [Universitas Hasanuddin]. In *Kaos GL Dergisi* (Vol. 8, Issue 75). <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125798>
<https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.02.002>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/810049>
<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.197505391>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090409500205>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090409500205>
- Rimayanti. 2005. *Pengaruh Proses Vitrifikasi dengan Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Daya Hidup Oosit Sapi*. 28–31. <http://journal.unair.ac.id/download-fullpapers-MKH-21-1-07.pdf>
- Sawo, K. 2017. Evaluasi Efisiensi Reproduksi Ternak Sapi Bali Betina Di Distrik Makimi. *Jurnal Fapertanak*, 11(2), 20–29. <https://uswim.ejournal.id/fapertanak/article/view/138/83>
- Suharyati, S., dan Hartono, M. 2017. Pengaruh Manajemen Peternak Terhadap Efisiensi Reproduksi Sapi Bali Di Kabupaten Pringsewu Provinsi Lampung. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 16(1), 61–67. <https://doi.org/10.25181/jppt.v16i1.77>
- Syaiful, F. L. 2021. Morfometri ovarium dan folikel sapi lokal sebagai penghasil oosit untuk fertilisasi in vitro. *Jurnal Embrio*, 61(13), 57–64. organ reproduksi ternak. Organ ini dapat menghasilkan hormon steroid yang berguna dalam proses kebuntingan. Saat terjadi kebuntingan ternak, ovarium mengalami perkembangan dan perubahan morfologis. Ovarium terdiri atas berbagai sistem yang terorganisir ya

- Syamsuddin, R. 2017. Pengaruh Diameter Oosit Sapi Bali Terhadap [UNIVERSITAS HASANUDDIN]. In *Skripsi*. <https://core.ac.uk/download/pdf/25495967.pdf>
- Syarifuddin. (2022). *Molasses Multinutrient Soft (MMS) dan Silase Molasses Multinutrient Soft (SMMS) Pakan Padat Gizi untuk Ternak Sap*. Yapensi.
- Triwulaningsi, E, P. Situmorang, I. G. Putu, T. Sugiarti, A. M. Lubis, D. A. Kusumaningrum, W. C, dan R. G. S. 2002. *Penggunaan Glutathione dalam Medium Fertilisasi Guna Meningkatkan Persentase Blastosis Embrio Sapi*. 116–123. <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/jitv/article/download/283/283>
- Triwulanningsih, E. N. T., Itumorang, P. S., Ugiarti, T. S., Ianturi, R. G. S., & Kusumaningrum, D. A. 2003. *Pengaruh Penambahan Glutathione pada Medium Pengencer Sperma terhadap Kualitas Semen Cair (Chilled Semen)*. 8(2), 91–97. [http://repository.pertanian.go.id/bitstream/handle/123456789/3187/The effect of glutathione addition in sperm diluent on the quality of bovine chilled semen.PDF?sequence=1&isAllowed=y](http://repository.pertanian.go.id/bitstream/handle/123456789/3187/The%20effect%20of%20glutathione%20addition%20in%20sperm%20diluent%20on%20the%20quality%20of%20bovine%20chilled%20semen.PDF?sequence=1&isAllowed=y)
- Wahjuningsih, S., & Djati, S. 2013. Ultrastruktur Oosit Kambing Pasca Kriopreservasi Dengan Metode Vitriifikasi. *Kedokteran Hewan*, 101–104. <https://jurnal.unsyiah.ac.id/JKH/article/download/915/851>
- Widyastuti, R., Padjadjaran, U., & Khoirinaya, C. 2018. *Perbandingan Viabilitas Oosit Pascavitriifikasi pada Dua Tingkat Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda Comparison of Oocyte Viability after Vitrification with Two Different Sucrose Conce* Perbandingan Viabilitas Oosit Pascavitriifikasi pada Dua Tingkat Konsen. February. <https://doi.org/10.15395/mkb.v49n4.1139>
- Widyastuti, R., Setiawan, R. 2015. Perbandingan Tingkat Kematangan Inti Oosit Sapi Pasca Maturasi In Vitro dengan Penambahan Serum Buatan 10% dan Fetal Bovine Serum 10%(*Jurnal Ilmu Ternak*15(2), 28–32. <http://jurnal.unpad.ac.id/jurnalilmuternak/article/view/9522>
- Yuniastuti, A. 2016. *Dasar Molekuler Glutation Dan Peranannya Sebagai Antioksidan*. FMIPA Unnes. http://lib.unnes.ac.id/27043/3/MONOGRAF_DASAR_MOLEKULER_GLUTATION.pdf
- Zhou CJ., Wu SN., Shen JP., Wang DH., Kong XW., Lu A., Li YJ., Zhou HX., Zhao YF., Liang CG. 2016. *The beneficial effects of cumulus cells and oocytecumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice*. PeerJ. 4:e1761. <https://doi.org/10.7717/peerj.1661>.
- Zuelke K.A., Jones D.P., Perreault S.D., 1997. *Glutathione oxidation is associateswith altered microtubule function and disrupted fertilizationin mature hamster oocytes*. *Biol Reprod* 57:1413-1420

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Data

Lampiran 1.a Analisis oosit Viabilitas

Between-Subjects Factors

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

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Viabilitas

Penambahan GSH pada media maturase	Mean	Std. Deviation	N
P0	53.8683	10.78119	6
P1	66.6283	8.72942	6
P2	69.3050	9.86528	6
P3	73.3333	8.16170	6
Total	65.7838	11.52386	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viabilitas

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1272.515 ^a	3	424.172	4.761	.012
Intercept	103860.042	1	103860.042	1.166E3	.000
Perlakuan	1272.515	3	424.172	4.761	.012
Error	1781.869	20	89.093		
Total	106914.427	24			

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viabilitas

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1272.515 ^a	3	424.172	4.761	.012
Intercept	103860.042	1	103860.042	1.166E3	.000
Perlakuan	1272.515	3	424.172	4.761	.012
Error	1781.869	20	89.093		
Total	106914.427	24			
Corrected Total	3054.385	23			

a. R Squared = .417 (Adjusted R Squared = .329)

Viabilitas

Penambahan GSH pada media maturasi	N	Subset	
		1	2
Duncan ^a P0	6	53.8683	
P1	6		66.6283
P2	6		69.3050
P3	6		73.3333
Sig.		1.000	.258

Lampiran 1.b Oosit Zona Pellusida Fraktur

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Zona_Pellusida_Fraktur

Penambahan GSH pada media maturase	Mean	Std. Deviation	N
P0	3.3333	8.16497	6
P1	.0000	.00000	6
P2	.0000	.00000	6
P3	1.3883	3.40071	6
Total	1.1804	4.35365	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Zona_Pellusida_Fraktur

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	44.790 ^a	3	14.930	.763	.528
Intercept	33.441	1	33.441	1.710	.206
Perlakuan	44.790	3	14.930	.763	.528
Error	391.157	20	19.558		
Total	469.389	24			
Corrected Total	435.948	23			

a. R Squared = .103 (Adjusted R Squared = -.032)

Lampiran 1c. Oosit yang mengalami Penyusutan Sitoplasma

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Penyusutan_Sitoplasma

Penambahan GSH pada media maturase	Mean	Std. Deviation	N
P0	26.1317	15.82890	6
P1	24.6817	8.67081	6
P2	17.6400	17.38856	6
P3	20.8333	10.20457	6
Total	22.3217	13.06584	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Penyusutan_Sitoplasma

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	265.313 ^a	3	88.438	.483	.698
Intercept	11958.163	1	11958.163	65.324	.000
Perlakuan	265.313	3	88.438	.483	.698
Error	3661.162	20	183.058		
Total	15884.638	24			
Corrected Total	3926.475	23			

a. R Squared = .068 (Adjusted R Squared = -.072)

Lampiran 1.d Oosit yang mengalami Sitoplasma lisis

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Sitoplasma_Lisis

Penambahan GSH pada media maturase	Mean	Std. Deviation	N
P0	16.6667	26.58320	6
P1	8.6900	11.16139	6
P2	13.0567	10.56332	6
P3	4.4433	7.57520	6
Total	10.7142	15.47381	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sitoplasma_Lisis

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	506.041 ^a	3	168.680	.675	.578
Intercept	2755.041	1	2755.041	11.018	.003
Perlakuan	506.041	3	168.680	.675	.578
Error	5001.053	20	250.053		
Total	8262.135	24			
Corrected Total	5507.094	23			

a. R Squared = .092 (Adjusted R Squared = -.044)

RIWAYAT HIDUP



Penulis Skripsi ini bernama Taufik Hidayat, lahir di Tanawasa Desa Mario pada tanggal 11 september 2000. Putra pertama dari pasangan bapak Sukiman dan Wahdania. Penulis berkebangsaan Indonesia dan beragama Islam.

Adapun riwayat pendidikan penulis, yaitu pada tahun 2007 masuk sekolah dasar di SD Negeri 185 Mario, dan selesai pada tahun 2013, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 2 Libureng, selesai pada tahun 2016 dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 22 Bone, 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 penulis aktif disalah satu himpunan di Fakultas Pertanian yaitu sebagai anggota tetap di Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) Universitas Bosowa.

Berkat petunjuk dan pertolongan Allah SWT, usaha dan disertai doa kedua orang tua dalam menjalani aktivitas akademik di perguruan Tinggi Universitas Bosowa Makassar. Alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan skripsi yang berjudul “Pengaruh Penambahan Antioksidan *Glutation Sulfhidril* (GSH) pada Media Maturasi Terhadap Kualitas Oosit Sapi Bali Pasca Kriopreservasi”.