

Perbandingan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* pada oosit mencit (*mus musculus* l.) Strain swiss webster dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan SPERMATOZOA hasil kriopreservasi

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Sarjana Sains



Oleh :

**DIAN KURNIAWATI
M0401019**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2006**

PENGESAHAN**SKRIPSI****PERBANDINGAN TINGKAT KEBERHASILAN PERKEMBANGAN
EMBRIO HASIL FERTILISASI *IN VITRO* PADA OOSIT MENCIT
(*Mus musculus L.*) STRAIN SWISS WEBSTER DENGAN
MENGUNAKAN SPERMATOZOA EPIDIDIMIS DAN
SPERMATOZOA HASIL KRIOPRESERVASI**

Oleh :
Dian Kurniawati
M 0401019

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal.....
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Surakarta,.....

Penguji III/Pembimbing I

Penguji I

Prof. Drs. Sutarno, M.Sc., Ph.D.
NIP. 131 649 948

Tetri Widiyani, M.Si.
NIP. 132 262 263

Penguji IV/Pembimbing II

Penguji II

Dra. Ekayanti M. Kaiin, M.Si.
NIP. 320 006 444

Ari Susilowati, M.Si.
NIP. 132 169 255

Mengesahkan :

Dekan F MIPA

Ketua Jurusan Biologi

Drs. Marsusi, M.S.
NIP. 130 906 776

Drs. Wiryanto, M.Si.
NIP. 1 124 613

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan maka gelar kesarjanaan yang telah diperoleh dapat ditinjau dan/ atau dicabut.

Surakarta, Mei 2006

Dian Kurniawati
NIM. M 0401019

ABSTRAK

Dian Kurniawati. 2006. PERBANDINGAN TINGKAT KEBERHASILAN PERKEMBANGAN EMBRIO HASIL FERTILISASI *IN VITRO* PADA OOSIT MENCIT (*Mus musculus* L.) STRAIN SWISS WEBSTER DENGAN MENGGUNAKAN SPERMATOZOA EPIDIDIMIS DAN SPERMATOZOA HASIL KRIOPRESERVASI. Biologi FMIPA. UNS.

Fertilisasi *in vitro* (FIV) adalah pembuahan sel telur oleh spermatozoa di luar uterus yang direkayasa oleh manusia. FIV digunakan untuk memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak dan dalam tingkat perkembangan yang seragam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi.

Mencit betina strain Swiss Webster berumur 2-6 bulan disuperovulasi dengan menyuntikkan 5 IU PMSG per ekor secara *intraperitoneal* setelah 48 jam kemudian disuntik dengan 5 IU hCG per ekor. Oosit dikoleksi dengan menoreh oviduk dalam medium HTF. Spermatozoa epididimis dikoleksi dengan menoreh kauda epididimis dalam medium HTF. Spermatozoa hasil kriopreservasi dicairkan dengan mencelupkan *straw* ke dalam *water bath* suhu 37 °C selama 2 menit. Kapasitasi dan fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan menggunakan medium HTF di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37 °C selama 1-1,5 jam. Oosit yang telah dikoleksi kemudian dimasukkan ke dalam suspensi spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi. Empat jam setelah inseminasi, oosit yang telah terfertilisasi dicuci dan dikultur dalam medium CZB. Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* diamati setiap 24 jam sampai terbentuk morula.

Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi menunjukkan tingkat keberhasilan yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), yaitu 2 sel (71,7794% dan 68,4181%), morula (52,6788% dan 53,3038%), keterlambatan perkembangan (47,3213% dan 46,6963%) serta degenerasi (28,2206% dan 31,7306%). Pada penelitian ini ditemukan beberapa kejadian abnormalitas embrio seperti pembelahan asimetris, fragmentasi dan embrio tanpa zona pelusida.

Kata Kunci : Fertilisasi *in vitro*, spermatozoa epididimis, spermatozoa hasil kriopreservasi, perkembangan embrio, morula

ABSTRACT

Dian Kurniawati. 2006. COMPARISON OF EMBRYO DEVELOPMENT OF SWISS WEBSTER MICE (*Mus musculus* L.) OOCYTE AFTER IN VITRO FERTILIZATION USING EPIDIDYMIC AND CRYOPRESERVED SPERMATOZOA. Departement of Biology. Mathematic and Basic Science Faculty. Sebelas Maret University.

In vitro fertilization (IVF) is a fertilization of ovum by spermatozoa outside the uterus engineered by human. IVF is used to produce many embryos in same development levels. This research was aimed to compare development of embryo after in vitro fertilization using epididymic and cryopreserved spermatozoa.

The female mice Swiss Webster aged 2-6 months was superovulated using 5 IU PMSG injected intraperitoneally, after 48 hours the female mice was injected with 5 IU hCG. Oocytes were collected with shallow cut of oviduct on HTF medium. Epididymic spermatozoa were collected with shallow cut of cauda epididymic on HTF medium. Cryopreserved spermatozoa were thawed by putting the straw into the water bath (37 °C) for 2 minutes. In vitro fertilization and capacitation were done using HTF medium inside the CO₂ 5% incubator (37 °C) for 1-1,5 hours. Collected oocytes were put into the suspension of epididymic spermatozoa and cryopreserved spermatozoa. After 4 hours, insemination fertilized oocytes were washed and cultured in CZB medium. The development of embryo in vitro were examined every 24 hours until the morula.

There is no differences between the development of embryo fertilized by epididymic spermatozoa and cryopreserved spermatozoa in vitro ($P > 0,05$), which were 2 cells (71,7794% and 68,4181%), morula (52,6788% and 53,3038%), delayed growth (47,3213% and 46,6963%) and degeneration (28,2206% and 31,7306%). In this research abnormality embryos was found such as assymetrys cleavage, fragmentation and zona pellucida-free embryo.

Keywords : In vitro fertilization, epididymic spermatozoa, cryopreserved spermatozoa, development of embryo, morula

MOTTO

"Jangan bersedih sesungguhnya Allah selalu bersama kita"

"Jalani hidup ini apa adanya dengan penuh ketulusan dan keceriaan
Niscaya Allah akan membukakan pintu keluar bagimu
maka tersenyumlah!"

"Dan, barangsiapa yang bertaqwa kepada Allah
niscaya Allah akan menjadikan baginya jalan kemudahan dalam urusannya"
(QS.Ath-Thalaq: 5)

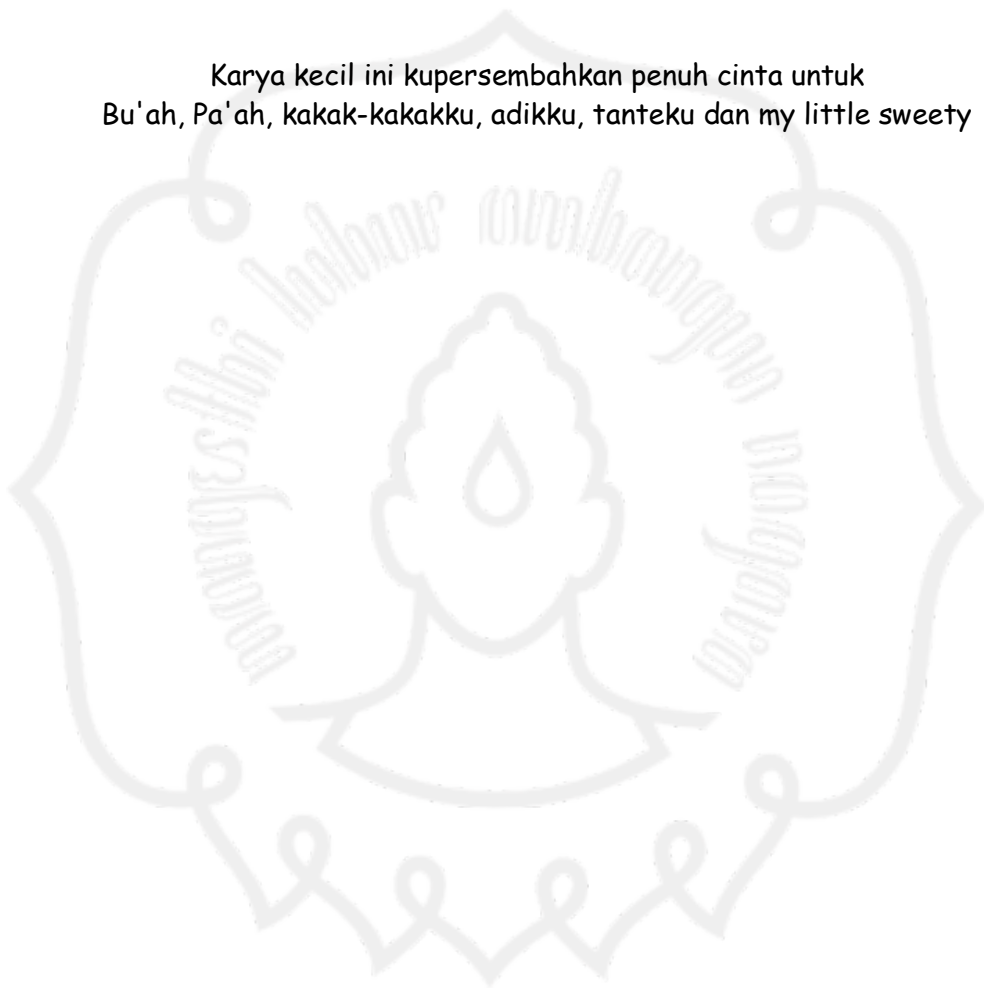
"Betapa banyak jalan keluar yang datang setelah rasa putus asa
dan betapa banyak kegembiraan datang setelah kesusahan.
Siapa yang baik sangka pada Pemilik 'Arasy dia akan memetik
manisnya buah yang dipetik di tengah-tengah pohon berduri."
('Aidh al-Qarni)

Salam Buat Sang Fajar

"Lihatlah hari ini.
Sebab ia adalah kehidupan, kehidupan dari kehidupan.
Dalam sekejap dia telah melahirkan berbagai hakikat dari wujudmu.
Nikmat pertumbuhan.
Pekerjaan yang indah.
Indahnya kemenangan.
Karena hari kemarin tak lebih dari sebuah mimpi.
Dan esok hari hanyalah bayangan.
Namun hari ini ketika Anda hidup sempurna,
telah membuat hari kemarin sebagai impian yang indah.
Setiap hari esok adalah bayangan yang penuh harapan.
Maka lihatlah hari ini.
Inilah salam untuk sang fajar."

PERSEMBAHAN

Karya kecil ini kupersembahkan penuh cinta untuk
Bu'ah, Pa'ah, kakak-kakakku, adikku, tanteku dan my little sweety



KATA PENGANTAR

Penelitian di bidang Bioteknologi Reproduksi yang mengkaji tentang perkembangan embrio telah mengalami kemajuan yang pesat mulai dari maturasi sel gamet sampai penelitian tentang kriopreservasi, vitrifikasi, *Intra Citoplasmic Sperm Injection*, cloning, transfer embrio dan pembuatan hewan chimera. Penelitian-penelitian tersebut menggunakan sel telur dalam tahap perkembangan tertentu. Salah satu usaha untuk memenuhi kebutuhan akan embrio tersebut adalah dengan memproduksi embrio melalui fertilisasi *in vitro* sehingga dengan teknik ini dapat diperoleh jumlah embrio yang lebih banyak dan dalam tahap perkembangan yang lebih seragam.

Penelitian tentang fertilisasi *in vitro* di Indonesia sampai saat ini masih sangat terbatas. Oleh karena itu, maka penelitian dilakukan dengan mengambil tema tentang fertilisasi *in vitro*, dengan judul "Perbandingan Tingkat Keberhasilan Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi *In Vitro* Pada Oosit Mencit (*Mus musculus* L.) Strain Swiss Webster Dengan Menggunakan Spermatozoa Epididimis Dan Spermatozoa Hasil Kriopreservasi". Diharapkan dari penelitian ini, dapat meningkatkan produksi embrio dalam berbagai tahap perkembangan untuk dapat digunakan dalam penelitian lebih lanjut dan dapat diterapkan pada hewan mamalia lain khususnya hewan yang hampir punah dan hewan ternak unggul.

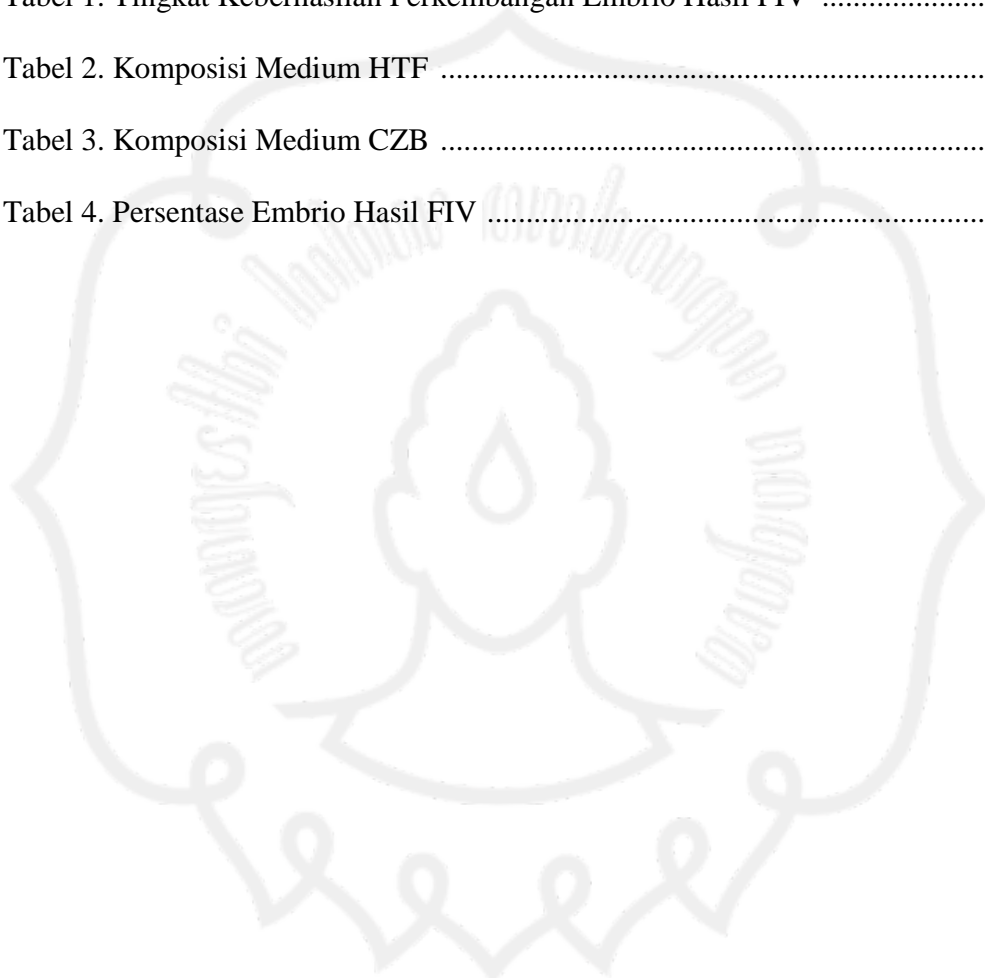
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN ABSTRAK.....	iv
HALAMAN ABSTRACT	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II. LANDASAN TEORI	6
A. Tinjauan Pustaka	6
1. Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	6
2. Sistem Reproduksi Jantan	7
3. Spermatozoa Epididimis	9
4. Spermatozoa Hasil Kriopreservasi	10
5. Sistem Reproduksi Betina	12
6. Superovulasi	15
7. Maturasi	17

8. Fertilisasi	18
9. Fertilisasi <i>In Vitro</i> (FIV)	19
10. Perkembangan Embrio	21
11. Kultur Embrio	22
B. Kerangka Penelitian	24
C. Hipotesis	26
BAB III. METODE PENELITIAN	27
A. Alat dan Bahan	27
B. Cara Kerja	28
C. Analisis Data	32
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
A. Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi <i>In Vitro</i> dengan Spermatozoa Epididimis dan Spermatozoa Hasil Kriopreservasi	33
B. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Tingkat Keberhasilan Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi <i>In Vitro</i>	36
BAB V. PENUTUP	49
A. Kesimpulan	49
B. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
HALAMAN UCAPAN TERIMA KASIH	57
LAMPIRAN	60
RIWAYAT HIDUP PENULIS	68

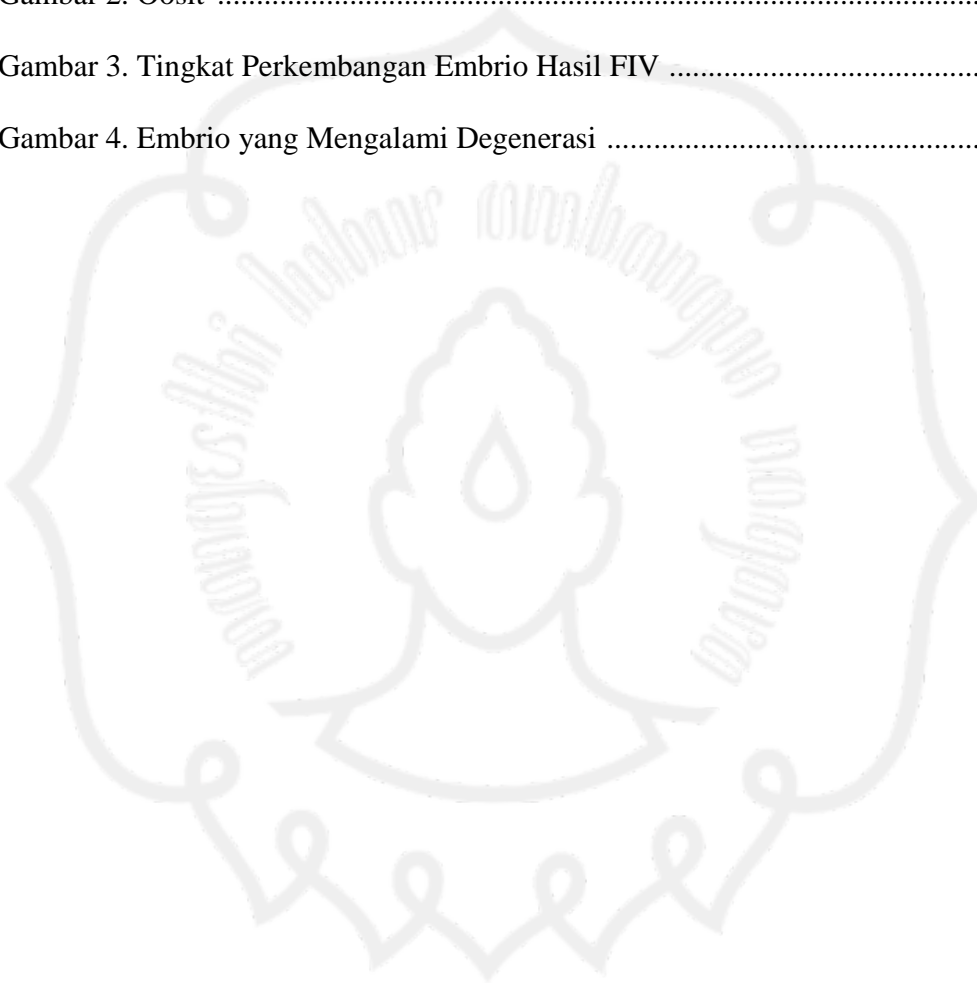
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Tingkat Keberhasilan Perkembangan Embrio Hasil FIV	33
Tabel 2. Komposisi Medium HTF	60
Tabel 3. Komposisi Medium CZB	61
Tabel 4. Persentase Embrio Hasil FIV	63



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Bagan Kerangka Pemikiran	25
Gambar 2. Oosit	40
Gambar 3. Tingkat Perkembangan Embrio Hasil FIV	42
Gambar 4. Embrio yang Mengalami Degenerasi	47



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Medium HTF	60
Lampiran 2. Komposisi Medium CZB	61
Lampiran 3. Cara Kriopreservasi Spermatozoa	62
Lampiran 4. Persentase Perkembangan Embrio Hasil FIV	63
Lampiran 5. Analisis Paired Samples T-Test Embrio Tahap 2 Sel	64
Lampiran 6. Analisis Paired Samples T-Test Keterlambatan Perkembangan	65
Lampiran 7. Analisis Paired Samples T-Test Embrio Tahap Morula	66
Lampiran 8. Analisis Paired Samples T-Test Embrio Degenerasi	67

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Mencit merupakan hewan percobaan laboratorium yang banyak digunakan dalam penelitian. Strain mencit yang digunakan untuk penelitian dapat berupa strain murni ataupun strain hasil mutasi. Sebagian besar penelitian khususnya di bidang genetika dan perkembangan embrio (Nakagata, 2000), serta manipulasi embrio (Hogan *et al.*, 1986) menggunakan mencit strain hasil mutasi. Sedangkan penelitian untuk uji patogenesis, imunologi, reproduksi dan transfer embrio menggunakan mencit strain murni (Anonim, 2004; Goenarso, 2004).

Peningkatan penggunaan berbagai strain mencit untuk penelitian di bidang biologi khususnya bioteknologi reproduksi untuk penelitian yang mengkaji tentang perkembangan embrio mulai dari maturasi sel gamet sampai dengan penelitian-penelitian kriopreservasi, vitrifikasi, *Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (ICSI), kloning dan pembuatan hewan khimera menyebabkan terjadinya peningkatan kebutuhan akan embrio. Penelitian-penelitian tersebut menggunakan sel telur dan embrio pada tahap perkembangan tertentu. Salah satu usaha untuk memenuhi kebutuhan tersebut adalah dengan memproduksi embrio secara *in vitro* melalui fertilisasi *in vitro* (Wilmot *et al.*, 1992).

Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu teknik pembuahan di luar rahim yang digunakan untuk memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang bersamaan. Penggunaan teknik *in vitro* sudah menjadi prosedur rutin pada banyak laboratorium untuk tujuan penelitian maupun pemuliaan ternak secara komersial (Fatchiyah dkk., 2000). Pada garis besarnya teknologi fertilisasi *in vitro* meliputi koleksi oosit, Maturasi *In Vitro* 1 Fertilisasi *In Vitro* (FIV) dan Kultur *In Vitro* (KIV). Keberhasilan FIV, diharapkan dapat menghasilkan embrio dalam jumlah banyak dengan kualitas yang baik, sehingga transfer embrio akan semakin dapat dikembangkan dengan biaya relatif murah dan penelitian manipulasi embrio dapat berkembang (Susilowati dkk., 1998). Dengan teknik FIV dapat dilakukan produksi embrio, pemilihan jenis kelamin (*sexing*), kloning, dan rekayasa genetik (Putro, 1992).

Fertilisasi *in vitro* dan perkembangan ovarium mencit telah diteliti secara ekstensif (Goto *et al.*, 1986). Banyak penelitian yang telah dilakukan dengan cara membuahi ova mencit dalam medium yang sederhana menggunakan sperma epididimis. Ovum manusia, sapi dan mencit diketahui dapat difertilisasi baik menggunakan spermatozoa epididimis maupun spermatozoa ejakulat (Edwards, 1973).

Ova yang difertilisasi secara *in vitro* telah sukses dikultur menjadi blastosis dalam oviduk yang dikembangkan dalam medium sederhana (Goto *et al.*, 1986). Hammond (1965) dalam Goto *et al.* (1986), pertama kali mengolah embrio mencit 8 sel menjadi blastosis menggunakan medium yang mengandung putih telur dalam larutan garam fisiologis. Embrio mencit 8 sel dapat berkembang menjadi blastosis ketika dikultur dalam larutan garam seimbang yang mengandung glukosa dan *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Biggers *et al.*, 1965; Chang, 1973). Bahkan, baru-baru ini di Amerika telah terjadi kemajuan dalam bidang FIV pada kuda yang telah sukses dilakukan dengan kapasitas spermatozoa menggunakan BSA (Choi *et al.*, 2003).

Spermatozoa epididimis mencit telah disuspensikan dalam berbagai larutan fisiologis untuk metode penyimpanan (Szczygiel *et al.*, 2002a). Kriopreservasi spermatozoa pada mencit telah diadakan sebagai simpanan (sediaan) sperma untuk digunakan dalam FIV (Nakagata *et al.*, 1997). Penyimpanan spermatozoa mencit dengan kriopreservasi mempunyai potensi yang besar karena sederhana, cepat dan murah dibandingkan dengan pemeliharaan embrio strain mencit transgenik (Kawase *et al.*, 2002; Bath, 2003). Spermatozoa diproduksi dalam jumlah yang besar

dibandingkan dengan oosit dan embrio. Oleh karena itu, konservasi gen di dalam genom haploid sperma adalah suatu alternatif menarik untuk teknik penyimpanan (Szczygiel *et al.*, 2002b). Kriopreservasi sperma merupakan teknik penyimpanan yang berperan penting untuk kebanyakan spermatozoa mamalia. Kesuksesan kriopreservasi sperma ditunjukkan dengan diperolehnya kembali motilitas dari spermatozoa beku yang dicairkan kembali sehingga dapat digunakan untuk FIV (Wakayama and Yanagimachi, 1998; Sztejn *et al.*, 2000).

Penelitian tentang interaksi gamet dan perkembangannya dengan menggunakan hewan uji mencit sebagai hewan model dapat diterapkan pada mamalia lain termasuk pada manusia (Austin and Short, 1982). Bahkan beberapa penemuan, penelitian dan pengkajian tentang reproduksi mamalia dengan menggunakan mencit sebagai hewan uji sangat berguna untuk pengembangan ilmu kebidanan, kajian tentang infertilitas (Austin and Short, 1982), determinasi kelamin, maturasi sel gamet, fertilisasi *in vitro*, transfer embrio, dan implantasi (Hogan *et al.*, 1986).

Berdasarkan latar belakang di atas, fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan dengan spermatozoa epididimis ataupun spermatozoa hasil kriopreservasi sehingga perlu dilakukan suatu penelitian untuk membandingkan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan kedua jenis spermatozoa tersebut. Penelitian ini diharapkan akan dapat meningkatkan produksi embrio dengan memanfaatkan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi untuk digunakan dalam fertilisasi *in vitro*. Penelitian ini juga diharapkan dapat diterapkan

pada hewan mamalia lain terutama untuk hewan yang hampir punah dan ternak unggul.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan permasalahan yaitu bagaimana perbandingan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* pada mencit dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi.

D. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dibidang bioteknologi reproduksi dan memberikan pengetahuan tentang fertilisasi *in vitro* pada mencit.
2. Penelitian tentang fertilisasi *in vitro* ini diharapkan dapat meningkatkan produksi embrio dalam berbagai tahap perkembangan untuk dapat digunakan dalam penelitian lebih lanjut.
3. Teknik FIV yang diperoleh diharapkan dapat diterapkan pada hewan-hewan mamalia lain khususnya hewan yang hampir punah dan hewan ternak unggul.



BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Mencit (*Mus musculus* L.)

Mencit merupakan salah satu hewan yang banyak digunakan untuk tujuan penelitian meliputi penelitian biologis maupun biomedis. Mencit mempunyai banyak strain baik *inbred* maupun *outbred* (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Strain *inbred* merupakan strain yang diperoleh melalui perkawinan dari induk yang sama. Strain *inbred* antara lain adalah strain Balb/c dan C(3)H. Sedangkan strain *outbred* merupakan strain yang diperoleh dari hasil perkawinan di luar hubungan keluarga

(perkawinan dari induk yang berbeda). Strain *outbred* antara lain adalah Parks dan Swiss (Gupta *et al.*, 2003; Anonim; 2004).

Mencit menguntungkan untuk penelitian embriologi, terutama dalam pemahaman yang lebih baik tentang ilmu janin mamalia. Keuntungan penggunaan mencit adalah mudah dalam pemberian pakan; pemeliharaan; pengawinan dan penanganannya; mencit mempunyai masa kebuntingan (*gestation*) yang pendek; dan masa aktivitas reproduksi yang panjang (dari umur 2 sampai 14 bulan) (Rugh, 1967).

Mencit mempunyai siklus estrus selama 5 sampai 5^{1/2} hari. Perkawinan dapat terjadi sepanjang 16 jam. Pembelahan pertama terjadi 24 jam setelah fertilisasi (Rugh, 1967). Fertilisasi pada sel telur mencit akan mengaktifasi kembali metafase II dan mengeluarkan badan polar kedua ke dalam perivitelin antara 2 sampai 3 jam setelah proses tersebut. Setelah 4 sampai 7 jam fertilisasi, nukleus sperma dan nukleus sel telur mulai dikelilingi oleh membran-membran disebut pronukleus. Pronukleus jantan mempunyai ukuran yang lebih bes⁶ dibandingkan dengan pronukleus betina. Beberapa jam selanjutnya, masing-masing pronukleus bergerak saling mendekat menuju ke bagian tengah dari sitoplasma kemudian keduanya saling melebur disebut singami (Johnson and Everitt, 1988).

Perkawinan yang terjadi pada mencit dapat diketahui dengan memeriksa adanya sumbat vagina (*vaginal plug*) pada mencit betina. Sumbat ini merupakan cairan seminal (semen) yang mengental dan berasal dari sekresi kelenjar khusus mencit jantan. Pada mencit betina sumbat ini tetap berada dalam vagina selama 16 sampai 48 jam dan tidak mudah jatuh keluar (Smith dan Mangkoewidjoyo, 1988).

2. Sistem Reproduksi Jantan

a. Testis

Testis menghasilkan spermatozoa dan testosteron atau hormon kelamin jantan. Masing-masing testis terdiri dari banyak sekali tubulus seminiferus yang dikelilingi oleh kapsul berserabut (trabekula). Trabekula melintas masuk dari tunika albugenia untuk membentuk kerangka (stroma) yang mendukung tubulus seminiferus (Frandsen, 1992).

b. Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah suatu proses yang mengubah sel-sel kelamin primer dalam testis menjadi spermatozoa (Frandsen, 1992). Spermatogenesis dimulai dengan pertumbuhan spermatogonium menjadi sel yang berukuran lebih besar disebut spermatosit primer. Sel-sel ini membelah secara meiosis I menjadi dua spermatosit sekunder yang sama besar, kemudian mengalami pembelahan meiosis II menjadi empat spermatid yang sama besar pula (Villemain dkk., 1988).

Spermatid adalah sebuah sel bundar dengan sejumlah besar sitoplasma yang merupakan gamet dewasa dengan sejumlah kromosom haploid. Spermatid mengalami proses perkembangan rumit disebut spermiogenesis. Spermiogenesis mencakup pembentukan akrosom, pepadatan dan pemanjangan inti, pembentukan flagellum, serta kehilangan sebagian besar sitoplasmanya. Spermiogenesis merupakan proses pertumbuhan dan diferensiasi yang mengubah spermatid menjadi spermatozoa fungsional (Villemain dkk., 1988). Pada saat transformasi spermatid menjadi

spermatozoa, inti spermatozoa secara fisik dan kimiawi menjadi stabil dengan terbentuknya ikatan disulfida (-S-S-) pada inti protamin (Said dkk., 2003).

c. Kapasitasi

Spermatozoa yang diambil dari testis secara eksperimental mempunyai kemampuan dalam membuahi ovum, tetapi umumnya kemampuan fertilisasi tersebut memerlukan pemasakan. Peristiwa itu terjadi pada waktu spermatozoa berjalan melalui epididimis. Pada proses pemasakan tersebut terjadi pengurangan kadar air dan penambahan gravitasi spesifik serta perubahan konsentrasi ion dalam spermatozoa (Frandsen, 1992).

Pada spermatozoa mamalia yang diejakulasikan atau yang diambil dari epididimis secara struktural telah sempurna namun masih belum mempunyai kemampuan untuk melakukan fertilisasi pada oosit. Spermatozoa agar berhasil melakukan fertilisasi memerlukan proses *kapasitasi* serta reaksi *akrosom*. Sistem reproduksi betina pada mamalia secara umum telah diketahui mempunyai kemampuan untuk menginduksi terjadinya proses-proses tersebut. Walaupun demikian, kapasitasi spermatozoa dapat juga terjadi dalam kondisi kultur. Dalam hal ini medium kultur mempengaruhi kemampuan kapasitasi spermatozoa (Permana dkk., 2000).

Kapasitasi adalah persiapan atau perubahan fisiologik spermatozoa di dalam saluran kelamin betina atau medium kultur untuk mempertinggi daya fertilisasinya. Selama kapasitasi terjadi perubahan-perubahan akrosom, yang berakhir dengan pelepasan enzim *hyaluronidase* (Toelihere, 1979).

3. Spermatozoa Epididimis

Spermatozoa adalah sel kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan tertentu (Parera dkk., 2000). Setiap spermatozoa terdiri dari kepala, bagian tengah (*middle piece*) dan ekor. Bagian kepala berisi *acrosom*, *nucleus* dan sejumlah struktur sitoskeleton serta sitoplasma, sedangkan bagian ekornya berisi *axonema* yaitu mikrotubulus beserta serabut yang memanjang dari kepala sampai akhir dari *axonema*. Nukleus yang terletak kira-kira di sepertiga panjang kepala mengandung bahan genetik yang dibutuhkan untuk membuahi ovum. Bagian tengah digunakan sebagai pusat tenaga karena mengandung mitokondria (Rugh, 1967; Frandson, 1992).

Spermatozoa bergerak dari tubulus seminiferus melewati duktus eferens menuju kepala epididimis. Epididimis merupakan pipa panjang dan berkelok-kelok yang menghubungkan vasa eferensia pada testis dengan vas deferens. Spermatozoa disimpan dalam epididimis dan vas deferens. Epididimis berperan sebagai tempat untuk pemasakan spermatozoa sampai pada saat spermatozoa dikeluarkan dengan ejakulasi. Spermatozoa belum masak ketika meninggalkan testikel dan harus mengalami periode pemasakan di dalam epididimis sebelum mampu membuahi ovum (Villey dkk., 1984; Frandson, 1992).

Mencit mempunyai ciri biologi yang hampir sama dengan tikus putih, begitu juga dengan spermatozoanya. Mencit dan tikus putih mempunyai kepala spermatozoa

berbentuk kait. Bila dibandingkan dengan spermatozoa tikus putih, spermatozoa mencit yang diambil dari epididimis memperlihatkan kemiripan morfologi pada bagian kepalanya. Tetapi, bagian kepala spermatozoa tikus putih lebih langsing dibandingkan dengan kepala spermatozoa mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988; Permana dkk., 2000).

4. Spermatozoa Hasil Krioperservasi

Krioperservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen dan oosit) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologi, biologi dan morfologi tetap ada (Gazali dan Tambing, 2002). Krioperservasi spermatozoa merupakan teknik yang berperan penting untuk kebanyakan mamalia dalam kelestarian jenisnya. Kesuksesan krioperservasi sperma ditunjukkan oleh kehidupan dari spermatozoa beku yang dicairkan kembali. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa hasil krioperservasi masih dapat membuahi ovum yang telah dilakukan dengan sukses secara IVF diikuti kultur embrio dan transfer embrio (Sztein *et al.*, 2000). Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa krioperservasi spermatozoa mencit harus mempertimbangkan perbedaan strain yang menentukan tingkat fertilisasi (Kawase *et al.*, 2002).

Metode krioperservasi sel spermatozoa dibedakan atas pembekuan lambat (*slow freezing*), pembekuan cepat (*rapid freezing*) dan pembekuan sangat cepat (*ultra rapid freezing*) (Gazali dan Tambing, 2002). Masalah utama dengan spermatozoa

mencit yang dikriopreservasi adalah kerusakan spermatozoa yang sering terjadi selama proses pembekuan dan pencairan kembali (Szczygiel *et al.*, 2002b).

Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku. Apabila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel, sedangkan apabila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Perhatian harus difokuskan pada prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum *deep freezing* maupun dehidrasi pada saat pencairan kembali (*thawing*) (Gazali dan Tambing, 2002).

Pada dasarnya tujuan utama kriopreservasi sel spermatozoa ialah melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan. Keuntungan kriopreservasi sel spermatozoa ialah sel sperma dapat disimpan dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat digunakan kapan saja bila diperlukan (Gazali dan Tambing, 2002).

5. Sistem Reproduksi Betina

a. Ovarium

Ovarium merupakan organ bagian sistem reproduksi yang memegang peranan penting sebagai penghasil sel kelamin betina (ovum). Ovarium juga berfungsi sebagai kelenjar endokrin yang memproduksi hormon-hormon yang berperan dalam siklus reproduksi (Leeson dkk., 1996; Turner dan Bagnara, 1988). Ovarium terdiri atas bagian medula yang mengandung jalinan vaskular luas di dalam jaringan ikat selular

longgar; dan bagian korteks merupakan tempat dijumpai folikel ovarium, yang mengandung oosit (Junqueira dkk., 1998).

b. Folikel-folikel Ovarium

Folikel ovarium adalah unit struktural dan fungsional dari ovarium mamalia, yang terdiri dari oosit, yang dikelilingi sel granulosa, membran basal (*basement membrane*) dan dihubungkan sel *theca* yang diatur bersebelahan dengan membran basal. Perkembangan folikel normal dari oosit ditunjukkan dengan kemampuannya untuk melakukan fertilisasi dan terjadinya perkembangan embrio (Wu *et al.*, 2001).

Terdapat banyak golongan folikel mulai dari tahap folikel primordial sampai dengan folikel yang telah masak. Menurut Gartner *et al.* (1988), tahap perkembangan folikel secara garis besar diklasifikasikan sebagai berikut:

- a. Folikel primordial dicirikan oleh adanya oosit dengan selapis sel skuamosa.
- b. Folikel primer selapis dicirikan oleh adanya oosit dengan selapis sel kubis atau kubus.
- c. Folikel primer berlapis dicirikan oleh adanya oosit dengan sel-sel folikel yang telah berproliferasi menjadi berlapis-lapis tanpa cairan folikel (*liquor folliculi*).
- d. Folikel sekunder dicirikan oleh adanya oosit dengan sel-sel folikel yang berlapis-lapis, diantara sel-sel folikel terdapat ruang-ruang (*antrum*) yang berisi cairan folikel (*liquor folliculi*).
- e. Folikel masak (*folikel de Graaf*) merupakan stadia perkembangan folikel yang telah mencapai maksimum dengan ruangan penuh berisi cairan folikel (*liquor folliculi*), oosit terletak eksentris dan disokong oleh *cumulus oophorus*.

Sel yang menjadi prekursor oosit disebut sel benih primordial dan berasal dari endoderm kantung kuning telur. Folikel primordial dan folikel yang sedang berkembang mengandung oosit primer ekuivalen dengan spermatosit primer dari tubulus seminiferus. Oosit ini berada dalam profase dari pembelahan meiosis pertama (Junqueira dkk., 1998).

c. Oogenesis

Sel kelamin primer betina menghasilkan satu ovum (ootid) masak dan tiga sel-sel rudimenter yang disebut badan-badan polar atau polosit (Frandsen, 1992). Ovum atau sel telur berkembang dalam ovarium dari sel kelamin yang belum masak yaitu oogonium. Oogonium berkembang menjadi oosit primer kemudian mengalami pembelahan meiosis pertama. Pada pembelahan meiosis pertama, oosit primer mengalami pembagian sitoplasma yang tidak sama sehingga menghasilkan satu sel besar disebut oosit sekunder dan satu sel kecil disebut badan kutub pertama. Dalam pembelahan meiosis kedua oosit sekunder membelah secara tidak sama sehingga menghasilkan sebuah ootid yang besar dan sebuah badan kutub kedua yang kecil. Pada saat yang bersamaan badan kutub pertama dapat membelah diri menjadi dua badan kutub. Ootid mengalami perubahan lebih lanjut sehingga menjadi ovum yang masak tanpa mengalami pembelahan sel. Ketiga badan kutub itu hancur dengan cepat sehingga tiap oosit primer hanya menghasilkan satu ovum (Villego dkk., 1984).

d. Ovulasi

Ovulasi merupakan proses keluarnya sel telur dari folikel. Folikel yang matang membentuk cairan yang lebih encer dari sebelumnya sehingga memperbesar

garis tengah folikel. Folikel yang terbungkus korteks yang menipis meletus pada stigmanya sehingga cairan folikel keluar ke dalam ruang peritoneum. Sel telur yang dikelilingi korona radiata terlempar dari kumulus dan keluar bersama cairan folikel. Peristiwa ini disebut ovulasi (Turner dan Bagnara, 1988).

Pada mencit, ovulasi terjadi secara spontan setiap 4 sampai 5 hari sekali (Hogan *et al.*, 1986). Ovulasi pada mencit dapat menghasilkan lebih dari 10 oosit dari setiap ovarium. Oosit tersebut bergerak menuju ke infundibulum. Silia dari infundibulum mempercepat transport oosit yang telah matang menuju ke ampula dari oviduk (Rugh, 1967).

6. Superovulasi

Superovulasi merupakan teknik penyuntikan hormon gonadotropin untuk memperbanyak folikel yang berkembang sehingga ovulasi terjadi lebih banyak dari normal (Sukra, 2000). Jumlah sel telur yang digunakan untuk produksi embrio *in vivo* dan *in vitro* dapat ditingkatkan dengan teknik superovulasi. Dengan teknik ini, selain dihasilkan sel telur juga dihasilkan hormon-hormon reproduksi yang berfungsi memelihara siklus dan fungsi organ reproduksi (Mohamad dkk., 2003).

Metode superovulasi dapat dilakukan dengan menyuntikan PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) atau FSH (*Follicels Stimulating Hormone*), secara subkutan atau intramuskuler. Perlakuan ini disusul dengan penyuntikan LH (*Lutein*

Hormone) intravena beberapa hari kemudian, dengan tujuan untuk menggetarkan ovulasi. Superovulasi merupakan sumber oosit untuk fertilisasi *in vitro* atau sumber embrio untuk embrio transfer. Penggunaan teknik superovulasi yang dilakukan sebelum pengambilan ovarium dapat mengoptimalkan perolehan sel telur. Sel telur hasil superovulasi dapat digunakan untuk produksi embrio *in vitro* dan ovarium sisanya masih dapat digunakan untuk tujuan pembekuan dan transplantasi (Driancourt and Fry, 1992; Sukra, 2000; Mohamad dkk., 2003).

Respons superovulasi dari hewan-hewan betina dewasa berbeda-beda menurut jenis hewan, berat hidup, fase siklus estrus, umur, musim, dan pemberian makanan. Jumlah sel telur yang diovulasikan sesudah penyuntikan gonadotropin juga tergantung pada potensi hormon yang dipakai, perbandingan FSH: LH, frekuensi penyuntikan yang berturut-turut dan dosis hormon (Toelihere, 1979).

Adapun hormon-hormon yang biasa digunakan untuk superovulasi adalah

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

Pada tahun 1930 Cole dan I lam Nalbandov (1990), menciptakan penemuan penting, bahwa darah kuda antara hari ke-40 dan hari ke-140 dari kebuntingannya mengandung hormon gonadotropin dalam jumlah yang besar. PMSG hampir seluruhnya ditemukan dalam darah. PMSG tetap berada di dalam aliran darah tidak hanya pada kuda betina yang sedang bunting tetapi juga pada hewan-hewan lain yang disuntik dengan PMSG.

PMSG merupakan hormon yang berguna untuk penelitian endokrin. Secara komersial hormon ini mudah didapatkan dan dapat disediakan dalam kondisi

laboratorium yang biasa, yaitu dengan cara mengambil darah kuda betina pada tahap kebuntingan yang tepat. Hormon ini terutama menyebabkan pertumbuhan folikel apabila diberikan secara subkutan dan menyebabkan ovulasi apabila disuntikkan secara subkutan kemudian diikuti dengan suntikan intravena (Nalbandov, 1990).

Penyuntikan hormon PMSG yang analog dengan FSH akan mencegah atresi folikel pendamping yang berukuran besar (Taya *et al.*, 1996). Hal ini terjadi karena dengan meningkatnya konsentrasi hormon FSH, maka semakin banyak ikatan reseptor-FSH pada folikel dan meningkat pula jumlah folikel dominan. Sel telur yang menunjukkan kekompakan sel-sel kumulus di sekelilingnya menunjukkan kualitas sel telur yang baik (Sirard and Blondin, 1996).

b. hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*)

hCG merupakan glikoprotein yang mempunyai berat molekul kira-kira 39.000 dan mempunyai struktur molekul serta fungsi yang sama dengan *Lutein Hormone* yang disekresi oleh hipofisis. Fungsi hCG yang terpenting adalah mencegah involusi normal dari korpus luteum dan menyebabkan korpus luteum mensekresi lebih banyak lagi hormon-hormon kelamin (progesteron dan estrogen) serta menyebabkan endometrium terus tumbuh dan menyimpan nutrisi dalam jumlah yang besar (Turner dan Bagnara, 1988).

7. Maturasi

Tahap pendewasaan (maturasi) adalah perubahan oosit primer ($2n$) menjadi oosit sekunder (n) atau ovum. Dalam proses ini terjadi pembelahan oosit primer menjadi oosit sekunder secara meiosis (Sukra, 2000). Oosit primer akan mengalami dua pembelahan setelah GVBD (*germinal vesicle breakdown*). Pembelahan meiosis pertama akan menghasilkan oosit sekunder dan badan polar pertama yang tampak dalam ruang perivitelin. Jumlah kromosom oosit berubah dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n). Pembelahan ini selesai sebelum terjadinya ovulasi. Pembelahan meiosis kedua dimulai segera setelah pembelahan meiosis pertama selesai dan tetap berlangsung sebelum terjadinya fertilisasi oosit oleh spermatozoa (Fibrianto dkk., 2000).

Maturasi dapat terjadi secara *in vivo* maupun *in vitro*. Maturasi secara *in vitro* dilakukan agar diperoleh oosit primer yang berkembang menjadi oosit sekunder. Oosit sekunder tersebut akan melakukan proses pembelahan meiosis dengan normal dan sempurna, sehingga dihasilkan sel telur yang siap dibuahi oleh spermatozoa dan dapat berkembang menjadi embrio dengan kualitas yang baik. Proses maturasi oosit primer perlu dilakukan sebelum terjadinya fertilisasi oleh spermatozoa dengan tujuan untuk meningkatkan angka keberhasilan fertilisasi (Fatchiyah dkk., 2000).

Peranan sel kumulus oophorus dalam maturasi oosit sangat mendukung pematangan oosit (Fatchiyah dkk., 2000). Kumulus oophorus berperan sebagai penghubung antara sel-sel stratum granulosum dengan oosit dan memungkinkan pemindahan molekul dari populasi sel-sel granulosa ke oosit (Putro, 1992). Sistem ini memudahkan produksi nutrien dan pengangkutan nutrien ke dalam oosit serta

memberikan nutrien selama pertumbuhannya; menghasilkan sinyal yang mengendalikan dan mengatur metabolisme oosit; berperan serta dalam formasi zona dan mengikuti *surge* (lonjakan) LH; dan mensintesis matriks yang disusun dari protein dan asam *hyaluronat* yang penting untuk transport di dalam oviduk atau dalam *trapping sperma* (Madison *et al.*, 1992; Sirard and Blondin, 1996). Hal tersebut dimungkinkan karena sel-sel kumulus oosit memiliki celah penghubung (*mikrovilli*), yang menyusup ke dalam zona pelusida dan berhubungan langsung dengan aparatus Golgi (Susilowati dkk., 1998).

8. Fertilisasi

Telur yang berkembang akan menjadi matang sehingga mampu mengadakan penyatuan dengan sperma, proses ini disebut fertilisasi (Villey dkk., 1988). Fertilisasi adalah proses peleburan sel spermatozoa dengan ovum membentuk zigot, yang merupakan proses awal pembentukan suatu individu (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Proses yang terkait langsung dengan fertilisasi meliputi; kapasitasi, reaksi akrosom sperma, fusi gamet jantan dan betina, pencegahan polispermi, dan penyelesaian pembelahan meiosis II oosit (Amin, 2000).

9. Fertilisasi *In Vitro* (FIV)

Bioteknologi reproduksi mulai berkembang terutama di negara-negara yang industrinya berkembang pesat seperti Amerika Serikat, Kanada, Australia, Eropa Barat dan Jepang. Teknologi ini meliputi FIV, pengumpulan embrio, transfer embrio,

pembelahan embrio dan pembekuan embrio (Putro, 1992). Teknologi pembiakan embrio sudah lama berkembang terutama dalam percobaan-percobaan di laboratorium. Teknologi ini umumnya dilakukan pada binatang, bahkan di dunia peternakan sudah berkembang pesat, sehingga menghasilkan banyak hewan ternak unggulan (Djati, 2003).

Penelitian yang telah dilakukan lebih dari dua puluh lima tahun dapat membuktikan bahwa proses fertilisasi dari beberapa spesies mamalia dapat berlangsung di luar tubuh sehingga muncul laporan-laporan mengenai percobaan pembuahan ovum di luar tubuh hewan mamalia betina. Proses ini disebut fertilisasi *in vitro* (FIV) (Supriatna dan Pasaribu, 1992; Salisbury dan VanDenmark, 1985).

a. Pengertian Fertilisasi *In Vitro*

Fertilisasi *in vitro* (FIV) adalah pembuahan sel telur oleh spermatozoa di luar uterus yang direkayasa oleh manusia. Oleh karena itu FIV ini dikenal dengan sebutan *man made embryo* (Sukra, 2000).

Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak. Teknik ini terdiri dari beberapa langkah yaitu koleksi oosit, maturasi oosit, koleksi spermatozoa, kapasitasasi spermatozoa, fertilisasi dan pembiakan embrio secara *in vitro* (Susilowati dkk., 1998; Fibrianto dkk., 2000).

b. Manfaat Fertilisasi *In Vitro*

Di bidang kedokteran, salah satu terapi infertilitas adalah dengan FIV yang dilanjutkan dengan transfer embrio. Dalam usaha pengembangbiakan ternak, masalah infertilitas merupakan faktor penghambat yang perlu diatasi dengan beberapa cara diantaranya dengan inseminasi buatan, FIV dan transfer embrio. Terapi yang akan dilakukan harus berdasarkan pertimbangan ekonomis, sehingga teknik terapi ini dapat dipakai untuk meningkatkan kapasitas reproduksi bibit ternak unggul dan mengatasi pemborosan sel-sel gamet yang melimpah. Selain itu teknik FIV dan transfer embrio pada hewan dapat dipakai sebagai uji biologis (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

FIV sangat bermanfaat dalam mempelajari proses fertilisasi dan membantu pengembangan metode praktis untuk pencangkakan embrio dari induk unggul ke induk yang kurang unggul. Fungsi induk yang kurang baik dapat sebagai tempat perkembangan anak yang berpotensi tinggi. Perkembangan pengetahuan semacam ini sangat membantu penelitian di bidang genetika dan fisiologi (Salisbury dan VanDenmark, 1985). Keberhasilan fertilisasi *in vitro* akan menghasilkan embrio dengan kualitas tinggi dan dalam jumlah yang besar. Hal tersebut menurut Saito, *et al.* (1984) dan Hafez (1993) dalam Amin (2000), tergantung pada pemilihan kondisi kultur yang optimal pada maturasi oosit sampai sel telur mengalami meiosis pada metafase II.

Teknologi FIV sangat menguntungkan, antara lain dalam peningkatan mutu genetik, pembekuan embrio sehingga dapat diperdagangkan dari suatu negara ke negara lain, dan pengembangan teknologi perekayasaan, seperti penentuan jenis

kelamin embrio (*embryo sexing*), penyayatan embrio menjadi dua atau lebih (*embryo splitting*) (Sukra, 2000).

Salah satu penerapan dari teknik fertilisasi *in vitro* pada mencit adalah untuk mendapatkan jumlah yang banyak dari tingkat pembelahan awal embrio yang berkembang secara lebih bersamaan. Kegunaan lain adalah untuk menghasilkan keturunan dari mencit tanpa melalui perkawinan dan dapat menghasilkan keturunan yang banyak pada saat bersamaan (Hogan *et al.*, 1986).

10. Perkembangan Embrio

Masuknya sperma ke dalam sel telur menyebabkan terjadinya rangkaian perubahan yang cepat yaitu penyelesaian pembelahan meiosis; penyatuan pronukleus jantan dan betina serta gerakan kompleks dari zat-zat dalam sitoplasma telur; laju konsumsi oksigen dan sintesis protein dalam telur spesies tertentu meningkat. Segera setelah fertilisasi, di dalam embrio mulai ada sel-sel yang memisahkan diri dan terjadi pembelahan sel yang berturut-turut (Villemain *et al.*, 1988, Salisbury dan VanDemark, 1985). Dalam tingkat ini embrio mengalami pembelahan menjadi sel-sel yang ukurannya berangsur-angsur mengecil sampai ukuran tertentu. Tiap sel yang terbentuk disebut blastomer (Sagi, 1999).

Pembelahan sel embrio terjadi melalui mitosis, sehingga setiap sel embrio mengandung kromosom diploid ($2n$) yang setengahnya berasal dari spermatozoa dan setengahnya lagi berasal dari ovum. Pembelahan dimulai dari inti dan diteruskan ke sitoplasma. Ovum yang telah dibuahi mengalami pembelahan pertama membentuk

embrio 2 sel. Embrio 2 sel segera membelah lagi menjadi embrio 4 sel. Pembelahan terus berlanjut hingga embrio menjadi 8 sel, 16 sel, 32 sel (Toelihere, 1979; Salisbury dan VanDemark, 1985).

Pada tingkatan embrio 16 sampai 32 sel, sel-sel berkumpul menjadi satu kelompok di dalam zona pelusida. Isi sel di dalam zona pelusida berbentuk seperti bola yang padat. Embrio tersebut dikenal sebagai morula. Cairan mulai menumpuk di dalam ruang-ruang interseluler dan terbentuk suatu rongga bagian dalam yang disebut *blastocoele*. Rongga tersebut semakin lama semakin besar dan berisi cairan. Embrio tahap ini disebut blastosis (Toelihere, 1979).

11. Kultur Embrio

Penguasaan dan aplikasi teknologi FIV telah mendorong para peneliti mencari kemungkinan baru yang memberi nilai tambah pemberdayaan embrio. Salah satu tujuannya agar zigot hasil FIV selain dapat dipakai seketika untuk keperluan transfer juga dapat disimpan sehingga dapat digunakan untuk keperluan kemudian hari. Ide ini berkembang sehingga ditemukan teknologi kultur embrio (Sukra, 2000).

Teknologi kultur embrio merupakan salah satu penentu keberhasilan dalam usaha produksi dan rekayasa embrio secara *in vitro*, khususnya embrio hasil FIV yang masih mempunyai jumlah dan daya hidup yang rendah. Salah satu penyebabnya adalah kondisi kultur yang suboptimum (Djuwita dkk., 2000).

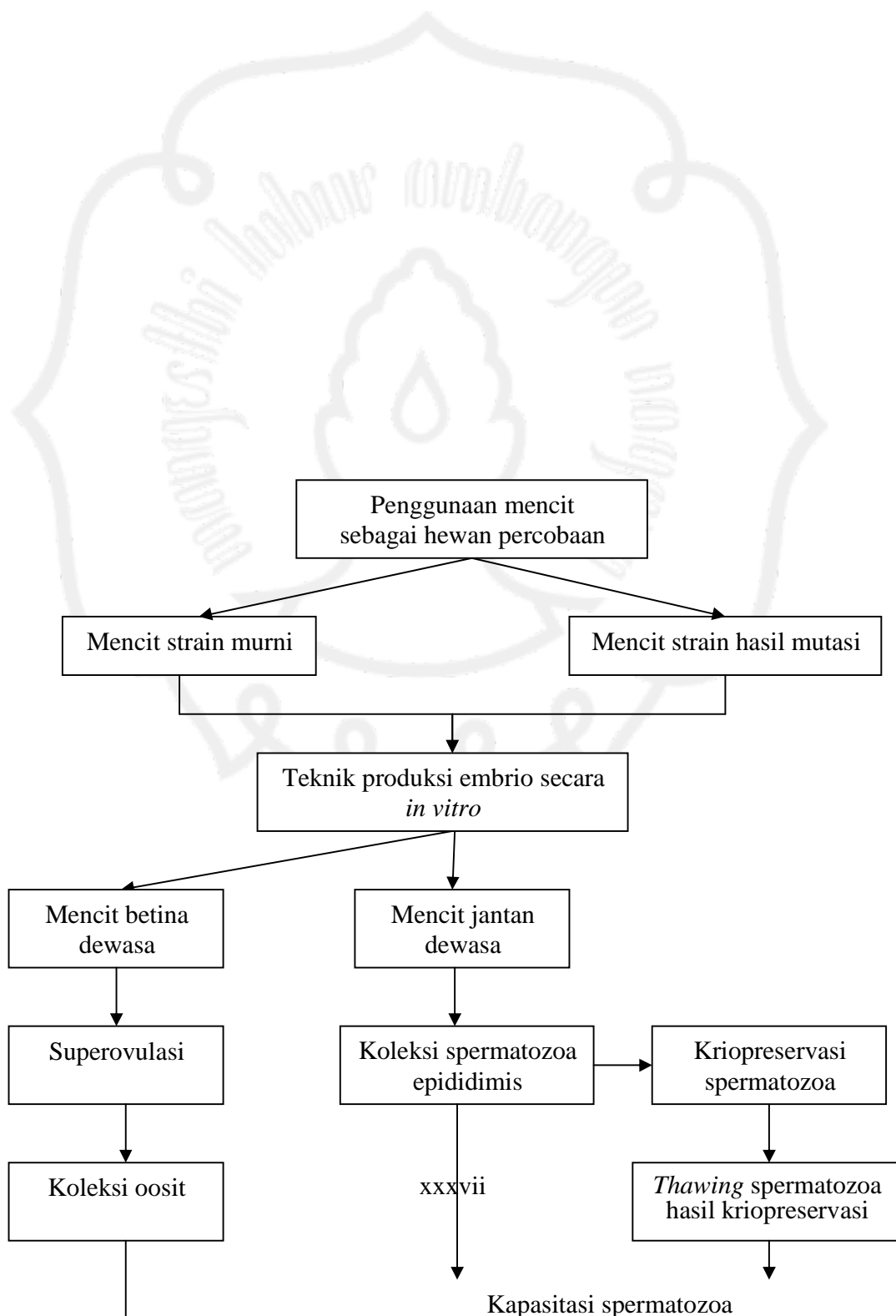
Kultur embrio dapat dilakukan dengan dua macam cara yaitu sistem kultur *in vivo* dan sistem kultur *in vitro*. Sistem kultur *in vivo* merupakan suatu sistem kultur

yang dilakukan dalam tubuh induk betina, misalnya di dalam oviduk. Sistem kultur embrio *in vitro* dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu sistem ko-kultur dan sistem kultur sintetik. Sistem ko-kultur menggunakan sel-sel tuba fallopi, sel-sel granulosa, atau sel-sel trofoblas sebagai medium. Sistem kultur sintetik ada dua kategori yaitu sistem medium kultur yang susunannya mirip dengan senyawa cairan tuba fallopi, dan sistem medium kultur sintetik konvensional yang susunannya terdiri atas larutan garam ditambah dengan sumber energi seperti piruvat, glukosa dan laktat, ditambah dengan serum fetus sapi (*Fetal Calf Serum* atau FCS) (Sukra, 2000).

Metoda kultur *in vitro* embrio pada umumnya menggunakan media yang telah diketahui komposisinya. Penambahan serum dalam media kultur dapat membantu pertumbuhan embrio mencit sampai tahap morula dan blastosis secara *in vitro* (Kaiin dan Tappa, 1994).

B. Kerangka Pemikiran

Semakin meningkatnya penelitian di bidang bioteknologi reproduksi yang menggunakan berbagai strain mencit, khususnya penelitian yang mengkaji tentang perkembangan dan manipulasi embrio menyebabkan terjadinya peningkatan terhadap kebutuhan embrio. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak dan dalam tahap perkembangan embrio yang seragam adalah dengan fertilisasi *in vitro* (Hogan *et al.*, 1987). Teknik ini dapat dijadikan model untuk diterapkan pada hewan mamalia lain, khususnya hewan yang hampir punah dan hewan ternak unggul.





Gambar 1. Diagram kerangka pemikiran penelitian

C. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa epididimis lebih baik dibandingkan dengan spermatozoa hasil kriopreservasi.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung dari bulan Agustus 2005 sampai Februari 2006 di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ternak Puslit Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Mencit betina dewasa strain Swiss Webster (berumur 2-6 bulan) dengan jumlah 35 ekor.
- b. Mencit jantan dewasa strain Swiss Webster (berumur 3-6 bulan) dengan jumlah 11 ekor.
- c. Medium Koleksi Spermatozoa Epididimis

Medium yang digunakan untuk koleksi spermatozoa epididimis dalam penelitian ini adalah HTF (*Human Tubal Fluid*).

Komposisi medium HTF menurut Nakagata (2000) di Lampiran 1.

- d. Medium Fertilisasi *In Vitro*

Medium yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* adalah HTF

e. Medium Kultur *In Vitro*

Medium kultur *in vitro* yang digunakan adalah CZB (*Chatot Ziomek Bavister*). Komposisi medium CZB menurut Uranga and Arechaga (1997) di Lampiran 2.

f. Hormon

Hormon yang digunakan untuk superovulasi adalah *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG, *Folligon*, *Intervet*) dan *Human Chorionic Gonadotropin*, (hCG, *Chorulon*, *Intervet*)

27

g. Bahan Kimia Lainnya

Bahan kimia lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuabidestilata steril sebagai pelarut medium, alkohol 70% untuk sterilisasi dan mineral oil untuk penutup medium pada petri kultur.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop bedah, mikroskop *inverted* fase kontras, mikroskop cahaya, alat bedah mencit, inkubator CO₂ (pada suhu 37°C, 5% CO₂), *syringe*, gelas benda, hemasitometer dan gelas penutup, pipet Pasteur, *coloni counter*, Petri sekali pakai (*Nunc*, diameter 3,5 cm), gelas arloji, *warm plate*, alat sterilisasi (oven dan autoklaf), *water bath*, mikropipet, *laminar air flow*.

C. Cara Kerja

1. Superovulasi

Mencit betina dewasa yang berumur 2-6 bulan disuperovulasi dengan menyuntikkan 5 IU PMSG dan 5 IU hCG per ekor secara intraperitoneal. Penyuntikan hCG dilakukan 48 jam setelah PMSG (Hogan *et al.*, 1986).

2. Persiapan Spermatozoa

a. Koleksi Spermatozoa Epididimis

Mencit jantan yang telah dewasa dibedah. Spermatozoa dikoleksi dengan mengambil 2 *cauda* epididimis yang ditoreh di dalam 1000 µl HTF sehingga diperoleh suspensi spermatozoa. Suspensi spermatozoa tersebut diambil 100 µl kemudian diencerkan dengan menambahkan 1000 µl HTF. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan sebesar $2,7 \times 10^7$ sel/ml. Suspensi sperma tersebut dibuat 2 spot sperma masing-masing 50 µl dalam petri sekali pakai kemudian ditutup dengan mineral oil.

Spermatozoa tersebut didiamkan selama 1-1,5 jam dalam inkubator CO₂ untuk kapasitasi. Koleksi spermatozoa epididimis untuk FIV dilakukan sebanyak 16 kali ulangan dengan setiap 2 kali ulangan menggunakan 1 ekor mencit.

b. *Thawing* Spermatozoa Hasil Kriopreservasi

Kriopreservasi spermatozoa telah dilakukan sebelumnya. Spermatozoa hasil kriopreservasi diperoleh dengan cara membekukan spermatozoa seperti pada Lampiran 3. *Straw* yang telah berisi spermatozoa beku dicelupkan dalam *water bath* dengan suhu yang dipertahankan 37°C selama 2 menit. Air yang menempel pada *straw* dibersihkan dengan kertas tisu kemudian kedua ujung *straw* tersebut dipotong dengan menggunakan gunting *straw*. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan sebesar 2,7 X 10⁷sel/ml. Suspensi spermatozoa yang telah cair dibuat 2 spot sperma dalam petri disposable kecil yang sama dengan 2 spot spermatozoa epididimis dan masing-masing spot 50 µl kemudian ditutup dengan mineral oil. Spermatozoa didiamkan selama 1-1,5 jam dalam inkubator CO₂ untuk kapasitasi spermatozoa (Sztejn *et al*, 2000). *Thawing* spermatozoa hasil kriopreservasi untuk FIV dilakukan sebanyak 16 kali ulangan dengan masing-masing ulangan menggunakan 3-4 *straw* dari 3 ekor mencit.

3. Persiapan Oosit

Mencit betina yang telah disuperovulasi kemudian didislokasi leher dan dibedah setelah 24 jam penyuntikan hCG. Koleksi oosit dilakukan dengan menoreh saluran kelamin betina (oviduk) mencit di dalam spot medium HTF (50 µl). Kualitas oosit pada mamalia dapat dibagi berdasarkan tiga kriteria yaitu kualitas jelek dengan oosit gundul tanpa kumulus oophorus; kualitas sedang dengan oosit dikelilingi lapisan kumulus oophorus tidak rata; dan kualitas baik dengan oosit dikelilingi lapisan kumulus oophorus yang mengembang (Madison *et al.*, 1992; Susilowati dkk., 1998). Oosit yang dikoleksi adalah oosit dengan kualitas baik kemudian dicuci dalam 50 µl medium HTF.

4. Fertilisasi *In Vitro*

Oosit yang telah dikoleksi dimasukkan ke dalam spot HTF yang telah berisi spermatozoa dengan konsentrasi sebesar 27×10^6 sel/ml, baik spermatozoa epididimis ataupun spermatozoa hasil kriopreservasi yang telah ditutup dengan mineral oil dan diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator CO₂ (CO₂ 5%, 37°C). Masing masing spot HTF berisi 5 -10 oosit. FIV dilakukan dengan 16 kali ulangan.

5. Kultur Embrio

Setelah 4 jam diinkubasi, oosit yang telah terfertilisasi diambil dari spot HTF dan dicuci dengan menggunakan 50 µl medium CZB sampai bersih. Oosit terfertilisasi yang sudah dicuci kemudian dimasukkan ke dalam 50 µl spot kultur yaitu CZB. Masing-masing spot CZB berisi 5 - 10 oosit terfertilisasi. Medium kultur diganti setiap 48 jam.

6. Pengamatan

Embrio hasil fertilisasi *in vitro* diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted* fase kontras perbesaran 400 kali sampai terbentuk tahap morula. Variabel yang diamati meliputi jumlah oosit yang difertilisasi, jumlah embrio 2 sel, jumlah embrio yang berkembang menjadi morula dan jumlah embrio yang mengalami degenerasi serta perkembangan yang lambat.

7. Pengumpulan Data secara Kuantitatif

Data kuantitatif diperoleh dengan melakukan penghitungan persentase jumlah embrio tahap 2 sel, tahap morula, keterlambatan perkembangan dan embrio yang mengalami degenerasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Embrio 2 sel} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

$$\text{Morula} = \frac{C}{B} \times 100\%$$

$$\text{Keterlambatan Perkembangan} = \frac{D}{B}$$

$$\text{Embrio Degenerasi} = \frac{E}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Jumlah oosit yang difertilisasi

B : Jumlah embrio tahap 2 sel

C : Jumlah morula.

D : Jumlah embrio yang mengalami keterlambatan perkembangan sehingga tidak mencapai morula.

E : Jumlah embrio yang mengalami degenerasi.

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian fertilisasi *in vitro* ini berupa tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dinyatakan dalam bentuk persentase pada tahap 2 sel, morula, keterlambatan perkembangan dan embrio yang mengalami degenerasi dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *Paired Samples T-Test* untuk menguji ada tidaknya perbedaan tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil FIV dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi *In Vitro* dengan Spermatozoa Epididimis dan Spermatozoa Hasil Kriopreservasi

Tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dalam penelitian ini meliputi embrio tahap 2 sel, morula, embrio yang mengalami keterlambatan perkembangan dan degenerasi. Hasil penelitian tentang tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil FIV dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat Keberhasilan Perkembangan Embrio Hasil FIV

Spermatozoa	Jumlah oosit yang difertilisasi	Jumlah embrio (%) mencapai tahap			Jumlah embrio degenerasi (%)
		2 sel	Morula	Keterlambatan perkembangan	

	A	B	C	D	E
Epididimis	113	81 (71,7794) ^a	42 (52,6788) ^a	39 (47,3213) ^a	32 (28,2206) ^a
Hasil kriopreservasi	105	72 (68,4181) ^a	38 (53,3038) ^a	34 (46,6963) ^a	33 (31,7306) ^a

Keterangan : huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan pada uji *Paired Samples T-Test*.

Tingkat keberhasilan perkembangan embrio hasil FIV dari spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi pada mencit strain Swiss Webster menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dari tahap 2 sel dan morula. Perhitungan statistik dengan uji *Paired Samples T-Test* untuk embrio tahap 2 sel dan morula dapat dilihat dalam Lampiran 5 dan 6. Hasil yang serupa terjadi pada embrio yang mengalami keterlambatan perkembangan dan degenerasi. Perhitungan statistik dengan uji *Paired Samples T-Test* untuk embrio yang mengalami keterlambatan perkembangan dan degenerasi dapat dilihat dalam Lampiran 7 dan 8. Hasil penelitian tentang tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang lengkap dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil ini menunjukkan bahwa spermatozoa hasil kriopreservasi dan spermatozoa epididimis mempunyai kemampuan yang sama dalam memfertilisasi oosit secara *in vivo* 33 ini membuktikan bahwa spermatozoa mencit dapat dikriopreservasi dengan baik sehingga spermatozoa dapat dijaga dari kerusakan selama proses pembekuan dan pencairan kembali, motilitas spermatozoa hasil kriopreservasi dapat dijaga setelah *thawing* sehingga mampu membuahi oosit seperti spermatozoa epididimis segar.

Krioprotektan sangat berperan dalam menjaga kemampuan spermatozoa hasil kriopreservasi untuk dapat memfertilisasi embrio selama pembekuan dan *thawing*. Dalam penelitian ini digunakan *Cryopreservation Solution* (CPS) yang mengandung 18% rafinosa dan 3% *skim milk* dalam akuabides yang sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nakagata (2000). Rafinosa merupakan karbohidrat seperti fruktosa yang berfungsi sebagai sumber energi spermatozoa pada kondisi anaerobik saat penyimpanan dan dalam kondisi aerobik 33 berada dalam saluran kelamin betina. Sedangkan susu (*skim milk*) berfungsi untuk menyediakan nutrisi bagi spermatozoa untuk menjaga spermatozoa dari kerusakan akibat suhu dingin (Toelihere, 1979). Dalam CPS juga ditambahkan penisilin-streptomisin yang berfungsi sebagai anti bakteri (Wildt, 1986) yang membunuh bakteri yang dapat menghambat laju metabolisme spermatozoa sehingga daya tahan hidup spermatozoa dapat dipertahankan (Bearden and Fuquay, 1997). CPS yang digunakan pada penelitian ini ditambahkan penisilin-streptomisin dan

mempunyai pH yang netral yaitu antara 7,0-7,2 karena krioprotektan yang terlalu asam ataupun terlalu basa dapat membunuh spermatozoa. Hal ini telah sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bavister (1981) dan Wildt (1986).

Tingkat perkembangan embrio secara *in vitro* selain dipengaruhi oleh teknik pembekuan spermatozoa juga dipengaruhi oleh strain mencit yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro*, karena setiap strain mencit mempunyai motilitas progresif spermatozoa yang berbeda sehingga kemampuan untuk memfertilisasi oosit juga berbeda. Beberapa strain mencit mengalami penurunan motilitas spermatozoa hasil kriopreservasi setelah *thawing* dibandingkan spermatozoa epididimis segar. Dalam penelitian ini diperoleh motilitas spermatozoa hasil kriopreservasi sebesar 30,31% sedangkan motilitas spermatozoa epididimis segar sebesar 72,76%. Menurut Sztein *et al.* (2000), beberapa mamalia mengalami penurunan motilitas spermatozoa epididimis sekitar 50% setelah proses kriopreservasi. Penurunan motilitas tersebut disebabkan karena pengaruh proses pembekuan sehingga tingkat fertilisasi spermatozoa hasil kriopreservasi mengalami penurunan dari spermatozoa epididimis segar tapi penurunan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan motilitas spermatozoa hasil kriopreservasi sebesar 30,31% masih dapat mempunyai kemampuan untuk memfertilisasi oosit secara *in vitro* yang tidak berbeda nyata dengan kemampuan spermatozoa epididimis.

B. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Tingkat Keberhasilan Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi *In Vitro*.

Keberhasilan proses perkembangan embrio yang diproduksi melalui fertilisasi *in vitro* dalam penelitian ini dipengaruhi oleh berbagai hal, seperti jenis medium yang digunakan tiap tahapan (kapasitasi, fertilisasi dan kultur), kualitas oosit (Suzuki, 1991 dalam Triwulaningsih dkk., 1994; Yulnawati, 2006), konsentrasi spermatozoa, osmolaritas dan pH medium (Nagai, 1996), serta kondisi kultur yang meliputi suhu, keseimbangan gas O₂ dan CO₂ (Boediono and Suzuki, 1996; Takahashi *et al.*, 1996).

Tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dihasilkan dengan menggunakan media kultur sangat beragam, khususnya embrio yang diperoleh melalui proses fertilisasi *in vitro* atau dari satu sel (zigot), jumlah dan daya hidup embrio yang dihasilkan masih rendah. Salah satu penyebabnya adalah kondisi kultur yang suboptimum (Djuwita dkk., 2000).

Kondisi kultur embrio sangat mempengaruhi tingkat keberhasilan perkembangan embrio lebih lanjut. Pada penelitian ini digunakan inkubator CO₂ 5% karena kandungan gas CO₂ 5% akan dapat mempertahankan pH medium agar tetap stabil. Kultur embrio dilakukan dalam kondisi CO₂ 5% agar sel dapat tumbuh dan membelah secara normal. Hasil penelitian Suzuki *et al.* (1999), menunjukkan bahwa inkubasi dengan 2,5% sampai 12,2% CO₂ dengan tekanan udara negatif akan mengurangi konsentrasi O₂ yang bermanfaat bagi tahap awal perkembangan embrio. Pada saat diinkubasi, sering terjadi perubahan pada media kultur *in vitro*, yang biasanya diakibatkan oleh kontaminasi, kehilangan zat-zat yang sangat dibutuhkan, dehidrasi,

perubahan pH dan denaturasi dari protein yang mengakibatkan kerusakan sel (Jakoby, 1993). Perubahan-perubahan tersebut dapat dihindari dengan kondisi CO₂ inkubator yang mendukung (Triwulaningsih dkk., 1994).

Kemampuan spermatozoa untuk hidup dan matang serta konsentrasi dan motilitas progresif spermatozoa dalam medium *in vitro* sangat menentukan tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio tahap praimplantasi dengan menggunakan spermatozoa epididimis segar maupun spermatozoa hasil kriopreservasi (Boediono dkk., 2000). Oleh karena itu dibutuhkan medium yang dapat mendukung proses kapasitasi dan fertilisasi secara *in vitro*. Medium yang digunakan untuk kapasitasi dan fertilisasi secara *in vitro* dalam penelitian ini adalah HTF (*Human Tubal Fluid*). HTF merupakan medium sintesis modifikasi dari cairan tuba falopi yang umum digunakan pada spermatozoa yang berasal dari ejakulasi maupun epididimis, terutama pada spermatozoa manusia (Xu *et al.*, 1999). HTF merupakan *defined medium* karena komposisinya diketahui dengan jelas dan dapat dibuat sendiri sehingga akan memudahkan dan menurunkan biaya produksi embrio secara *in vitro*.

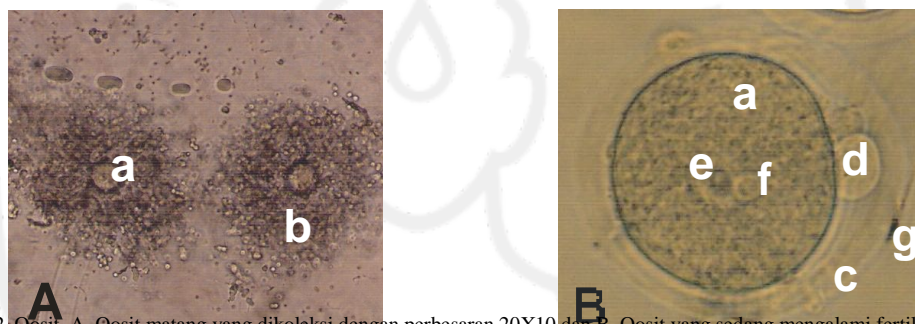
Medium HTF terdiri dari garam-garam anorganik yang berguna untuk menjaga keseimbangan ion intraseluler dan ekstraseluler selama kapasitasi dan fertilisasi secara *in vitro*, sodium piruvat, asam laktat dan glutamin sebagai sumber energi, glukosa dan beberapa bahan lain yang mendukung proses pematangan inti selama kapasitasi, NaHCO₃ sebagai *buffer* medium (Yulnawati, 2006) dan penisilin-streptomisin sebagai anti bakteri (Wildt, 1986).

Pada proses kapasitasi terjadi perubahan pH intraseluler. Medium HTF yang mengandung natrium bikarbonat berfungsi untuk menjaga pH dan menstimulasi aktivitas *adenilate cyclase*. pH medium yang stabil akan mempengaruhi proses fisiologi yang berlangsung normal sehingga viabilitas, proses kapasitasi dan motilitas spermatozoa tetap terjaga (Biggers and Mastroianni, 1981). Periode inkubasi spermatozoa untuk kapasitasi *in vitro* bervariasi tiap spesies yaitu pada kelinci selama 5 sampai 6 jam, 2 jam pada golden hamster dan 1 jam pada mencit (Knobil dan Neill, 1988). Periode inkubasi untuk proses kapasitasi spermatozoa mencit secara *in vitro* dalam penelitian ini dilakukan selama 1 sampai 1,5 jam sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Sztejn *et al.* (2000).

Keberhasilan perkembangan embrio selain dipengaruhi oleh medium kapasitasi dan fertilisasi *in vitro* juga dipengaruhi oleh medium kultur *in vitro*. Dalam penelitian ini medium kultur *in vitro* yang digunakan adalah CZB. CZB merupakan medium yang sering digunakan untuk kultur embrio secara *in vitro* karena dapat mengatasi sel blok (hambatan *cell block*). Hal ini diduga karena CZB mengandung EDTA dan glutamin yang mampu mengatasi sel blok khususnya pada mencit (Hoshi and Toyoda, 1985). Medium CZB mengandung NaCl dan KCl sebagai garam anorganik yang mengatur osmolaritas medium, asam amino esensial dan nonesensial yang diperlukan bagi metabolisme embrio pra dan pasca implantasi yang mendukung proses perkembangan embrio, sodium piruvat, asam laktat dan glutamin sebagai sumber energi, glukosa dan beberapa bahan lain yang mendukung proses pematangan inti dan perkembangan embrio selanjutnya serta NaHCO₃ sebagai *buffer* yang akan mempertahankan derajat keasaman (pH) medium. NaHCO₃ sebagai *buffer* dalam medium dengan konsentrasi

CO₂ yang konstan dan lingkungan kultur akan memberikan pengaruh terhadap pH medium, tapi hanya mampu menjaga kestabilan pH dalam interval pH yang cukup jauh (6,7-7,8) sehingga tidak dapat menjaga embrio dari kerusakan akibat perubahan pH (Yulnawati, 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini pH medium kultur yang digunakan berkisar antara 7,2-7,4. Hal ini juga telah sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wales (1969) yang menyatakan bahwa pH medium kultur *in vitro* yang optimum untuk mendukung perkembangan embrio praimplantasi sebesar 7,2-7,6. Medium kultur CZB juga mengandung serum yang berupa BSA. Penambahan serum dalam medium kultur dapat membantu perkembangan embrio secara *in vitro*. Hal ini disebabkan karena serum mengandung materi yang dapat mempengaruhi perkembangan embrio (Kaiin dan Tappa, 1994).

Pada penelitian ini, keberhasilan proses produksi embrio melalui fertilisasi *in vitro* juga dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan untuk FIV. Oosit yang digunakan untuk FIV harus sudah matang (inti maupun sitoplasma) sehingga oosit yang digunakan berada pada tahap metafase II. Kualitas oosit matang yang baik digunakan dalam fertilisasi *in vitro* yaitu oosit yang dikelilingi oleh lapisan sel-sel *cumulus oophorus* yang mengembang rata (Gambar 2A). Fertilisasi *in vitro* dilakukan pada oosit dengan kualitas baik agar dapat mendukung proses perkembangan embrio lebih lanjut.



Gambar 2. Oosit. A. Oosit matang yang dikoleksi dengan perbesaran 20X10 dan B. Oosit yang sedang mengalami fertilisasi *in vitro* (embrio tahap 1 sel) dengan perbesaran 40X10. Keterangan : a. Oosit, b. Sel-sel kumulus, c. Zona pelusida, d. Badan polar, e. Pronukleus jantan, f. Pronukleus betina, g. Spermatozoa.

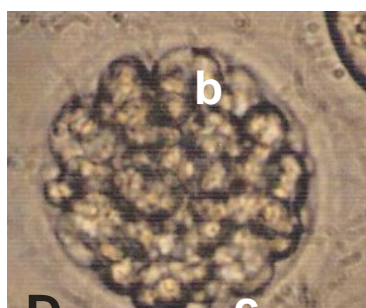
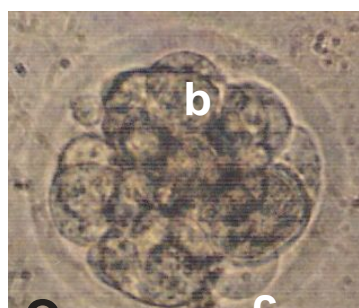
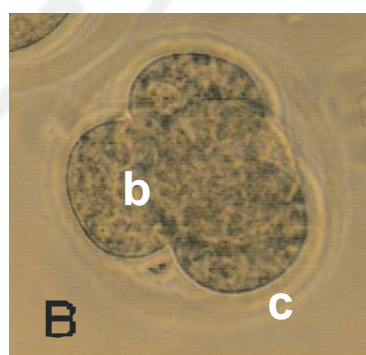
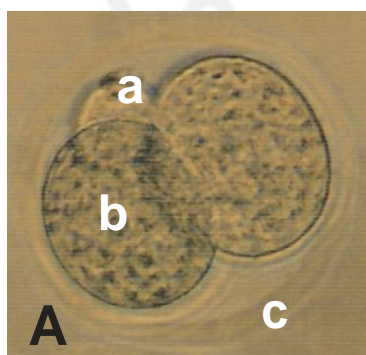
Masuknya sperma ke dalam sel telur menyebabkan terjadinya rangkaian perubahan yang cepat yaitu penyelesaian pembelahan meiosis; penyatuan pronukleus jantan dan betina serta gerakan kompleks dari zat-zat dalam sitoplasma telur. Pada tahap awal fertilisasi setelah spermatozoa menembus vitellus, terjadi perubahan kondensasi spermatozoa menjadi dekonvensi, kepala spermatozoa membengkak dan kehilangan bentuknya yang khas kemudian selaput yang menyelubunginya menghilang sehingga kepala spermatozoa makin lama makin menghilang. Setelah itu, segera nukleoli tampak, mula-mula seperti titik-titik kecil lalu perlahan-lahan bersatu membentuk butiran yang besar dan bulat yang tergabung dalam pronukleus yang diselubungi oleh selaput nukleus, sehingga terbentuk pronukleus jantan (Toelihere, 1979; Balinsky, 1997). Sedangkan pada oosit terjadi penyelesaian metafase II dan segera menyelesaikan pemasakan dari metafase II ke telofase II (Rugh, 1971). Pada saat telofase II, nukleoli mulai tampak kemudian berkembang dan membengkak yang akhirnya membentuk pronukleus betina (Rothschild,

1956), seperti yang dapat dilihat dari hasil penelitian ini (Gambar 2B). Selanjutnya terjadi fusi antara pronukleus jantan dan pronukleus betina (Sukra, 2000). Membran pronukleus menghilang dan kromosom-kromosomnya berkumpul di spindle kemudian terjadi pembelahan pertama (Hogan *et al.*, 1986) dan dilanjutkan dengan diferensiasi embrio (Santiago and Marzluff, 1989).

Periode inkubasi untuk fertilisasi *in vitro* tiap spesies berbeda-beda. Pada kambing inkubasi dilakukan selama 17 sampai 24 jam (Boediono dkk., 2000), sapi selama 5 jam (Triwulaningsih dkk., 1994) sampai 7 jam (Margawati dkk., 2000) dan mencit selama 4 jam (Hogan *et al.*, 1987) sampai 5 jam (Sztejn *et al.*, 2000). Fertilisasi pada mencit berlangsung dengan sempurna untuk setiap oosit dalam jangka waktu 2 sampai 4 jam (Salisbury dan VanDemark, 1985) sehingga dalam penelitian ini inkubasi untuk fertilisasi *in vitro* dilakukan selama 4 jam.

Kejadian akhir yang diakibatkan oleh fertilisasi adalah pembelahan mitosis berulang-ulang dari telur yang disebut pembelahan (*cleavage*) (Vilée dkk., 1988). Jumlah blastomer yang merupakan sel-sel embrional, selama perkembangan embrionik sampai munculnya *blastocoele* akan terus meningkat secara geometrik (Kuzan and Wright, 1986). Zigot yang terbentuk dari hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi dapat tumbuh dan membelah menjadi 2, 4, 8, 16 sampai membentuk morula dan kemudian membentuk blastosis. Anderson (1971), melaporkan bahwa pembelahan zigot berlangsung secara cepat, sehingga blastomer membesar, namun makin lama volumenya makin mengecil sehingga terbentuk sekelompok blastomer yang disebut morula, seperti yang dapat dilihat dari hasil penelitian ini (Gambar 3D). Setelah embrio berada dalam tahap morula, selanjutnya embrio akan terus berkembang menjadi blastosis. Embrio tahap blastosis ditandai dengan munculnya *blastocoele* karena ruang intraseluler dipenuhi oleh cairan seluler sehingga terbentuk rongga (Toelihere, 1979).

Berikut ini disajikan gambar perkembangan embrio dari tahap 2 sel (Gambar 3A), 4 sel (Gambar 3B), 8-16 sel (Gambar 3C) dan morula (Gambar 3D).



Gambar 3. Tingkat perkembangan embrio hasil FIV. Embrio tahap 2 sel (A), 4 sel (B), 8-16 sel (C) dan Morula (D). Keterangan : a. Badan polar, b. Blastomer, c. Zona pelusida (Perbesaran 40X10).

Pada penelitian ini didapatkan beberapa embrio yang mengalami keterlambatan perkembangan sehingga tidak mencapai tahap morula. Hal ini diduga disebabkan karena konsentrasi glukosa dalam medium kultur *in vitro* yang kurang sesuai untuk setiap tahap perkembangan embrio. Pada umumnya embrio yang dihasilkan melalui fertilisasi *in vitro* atau mulai dikultur pada tahap zigot dalam medium kultur akan mengalami hambatan perkembangan embrio tahap awal yang dikenal dengan fenomena *cell-block* (Djuwita dkk., 2000). Hambatan perkembangan embrio yang dikultur secara *in vitro* merupakan suatu fenomena yang umum terjadi pada berbagai embrio dari berbagai spesies (Barnet dan Bavister 1993 dalam Yulnawati, 2006). Tahap terjadinya hambatan pada tiap spesies berbeda-beda, yaitu pada embrio antara tahap 2 sampai tahap 8 sel (Miyoshi *et al.*, 1994). Embrio mencit dan tikus sering mengalami hambatan pada tahap 2 sel (*two cell block*) (Hogan, 1987), sedangkan embrio sapi dan domba pada tahap 8 sel (Gordon, 1994). Kejadian tersebut sangat dipengaruhi konsentrasi glukosa dalam medium kultur *in vitro*. Menurut Djuwita dkk. (2000), konsentrasi glukosa yang tinggi akan menghambat perkembangan embrio tahap awal (tahap 2 sel), tetapi konsentrasi glukosa yang tinggi dibutuhkan untuk perkembangan embrio mencapai tahap blastosis.

Pada mencit, hambatan *cell-block* pada perkembangan embrio tahap 2 sel menyebabkan terjadinya penurunan jumlah embrio yang dapat berkembang menjadi tahap berikutnya sehingga tidak semua embrio yang dikultur *in vitro* mampu berkembang menjadi morula. Pada penelitian ini hambatan *cell-block* dapat diminimalkan dengan pemakaian medium CZB yang mengandung EDTA dan glutamin. Glutamin merupakan substrat sumber energi sebagai pengganti glukosa yang berguna untuk mengatasi hambatan perkembangan tahap 2 sel (Barnett dan Bavister, 1996 dalam Yulnawati, 2006).

Kadar glukosa yang tinggi akan menghambat perkembangan embrio tahap 2 sel. Hal ini diduga bahwa metabolisme glukosa yang tinggi akan menghasilkan oksigen radikal bebas yang lebih banyak dibandingkan jumlah piruvat yang dapat mengikatnya sehingga mengakibatkan gangguan pada perkembangan embrio tahap awal. Memasuki tahap 8 sel kebutuhan embrio terhadap glukosa mulai meningkat, begitu pula pada saat memasuki tahap morula dan blastosis, kebutuhan embrio terhadap glukosa semakin meningkat (Djuwita dkk., 2000). Peningkatan kebutuhan glukosa pada tahap 4 sel diduga disebabkan karena mulai aktifnya genom embrio yang mensintesis rRNA yang memerlukan energi yang lebih tinggi, diantaranya diperoleh dari metabolisme glukosa (Hogan *et al.*, 1986). Sedangkan memasuki tahap morula dan blastosis, meningkatnya kebutuhan akan glukosa diduga berkaitan dengan mulainya diferensiasi sel untuk membentuk *inner cell mass* (ICM), trofoblas dan blastocoel (Djuwita dkk., 2000).

Pada tahap perkembangan embrio 8 sel pada mencit muncul reseptor insulin sehingga kebutuhan embrio terhadap glukosa meningkat. Perkembangan embrio dapat didukung dengan menambahkan insulin ke dalam medium kultur *in vitro*. Hal ini disebabkan karena insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa sebagai sumber energi sehingga penggunaan glukosa sebagai sumber energi utama baru akan efektif setelah 8 sel (Kaye *et al.*, 1992 dalam Yulnawati 2006). Sebelumnya embrio menggunakan piruvat dan laktat sebagai sumber energi. Pada tahap awal pembelahan, embrio mencit dapat berkembang dengan laktat sebagai satu-satunya sumber karbohidrat dari luar (medium). Sedangkan pada tahap selanjutnya dapat juga menggunakan glukosa (Austin and Short, 1982). Penambahan asam amino ke dalam medium bersamaan dengan piruvat dan laktat telah terbukti dapat meningkatkan perkembangan embrio tahap 8 sel. Insulin dan BSA memberikan efek positif untuk pertambahan jumlah sel embrio, namun juga dapat memberikan efek *additive* ketika keduanya dikombinasi dalam satu medium (Barnet and Bavister; 1996 dalam Yulnawati, 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini hanya digunakan BSA untuk mendukung proses perkembangan embrio lebih lanjut.

Pada awal pembelahan embrio, bahan-bahan dalam medium kultur lebih banyak digunakan dari pada saat tahap akhir morula dan awal blastosis oleh karena itu dibutuhkan penggantian medium pada 48 jam setelah inkubasi. Pada tahap perkembangan awal embrio jalur utama oksidasi glukosa melalui *hexosa monophosphat*. Kemudian, pada tingkatan permulaan blastosis, derajat respirasi tiba-tiba meninggi, dan oksidasi glukosa berubah ke jalur Embden-Mayerhof dan siklus *tricarboxylic acid* (Frindhandler, 1961 dalam Toelihere, 1979).

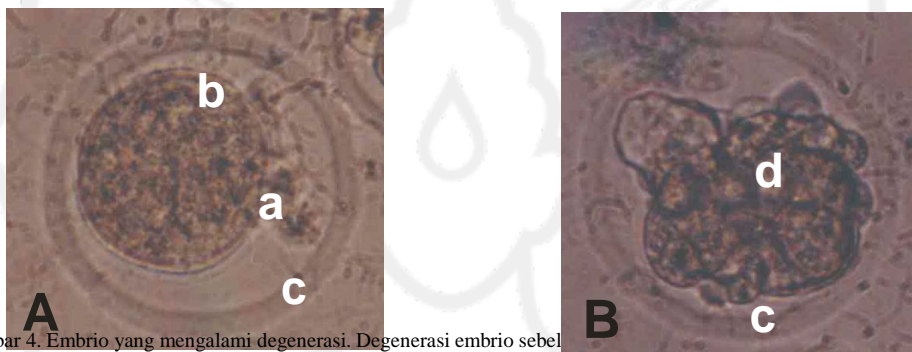
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa embrio mengalami hambatan pada tahap perkembangan selanjutnya mencapai blastosis. Hambatan perkembangan tersebut diduga karena maternal mRNA spesifik yang berperan pada masa kritis dari periode kompaksi dan diferensiasi blastosis terakumulasi pada tahap akhir perkembangan folikel. Pada tahap tersebut oosit telah mengalami sintesa faktor maternal yang diperlukan untuk menunjang proses maturasi, fertilisasi dan perkembangan embrio tahap awal (Boediono dkk., 2000).

Kegagalan fertilisasi dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain yaitu, tingkat pematangan oosit (inti maupun sitoplasma) yang kurang sempurna, kemampuan spermatozoa memfertilisasi oosit (kapasitasi dan reaksi akrosom) yang kurang memadai sehingga menyebabkan spermatozoa tidak mampu membuahi oosit, kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit sehingga terjadi kegagalan pembentukan pronukleus jantan (Bavers *et al.*, 1997; Boediono dkk., 2000).

Menurut Cohen *et al.* (1969) dalam Harjanti (2002), pada dasarnya terdapat dua jenis abnormalitas yang terjadi pada proses fertilisasi yaitu, yang pertama adalah kegagalan dalam penetrasi spermatozoa ke dalam oosit dan hambatan dekontensasi spermatozoa dan yang kedua adalah terdapat dua atau lebih pronukleus akibat masuknya lebih dari satu spermatozoa ke dalam oosit yang menyebabkan terjadinya poliploidi pada zigot. Pada penelitian ini, kegagalan penetrasi dan dekontensasi spermatozoa ke dalam oosit diduga menyebabkan degenerasi embrio tahap 1 sel. Sedangkan pada keadaan terdapatnya lebih dari satu spermatozoa yang dapat menembus membran vitelin oosit disebut polisperma. Peristiwa ini akan menyebabkan terjadinya

peningkatan terhadap abnormalitas embrio sehingga diduga akan menghambat perkembangan embrio lebih lanjut. Kualitas oosit sangat berpengaruh terhadap terjadinya polispermi. Umur oosit dapat mengurangi ketahanan reaksi zona terhadap penangkisan terjadinya polispermi yang akan menembus zona dan vitellin (Toelihere, 1979). Polispermi selain dipengaruhi oleh kualitas oosit juga dipengaruhi oleh konsentrasi spermatozoa (Boediono dkk., 2000). Konsentrasi spermatozoa epididimis dan hasil kriopreservasi yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dalam penelitian ini sebesar $2,7 \times 10^7$ sel/ml. Konsentrasi spermatozoa ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Nakagata (2000) yaitu sebesar $1,0-3,0 \times 10^7$ sel/ml dan Szczygiel *et al.* (2002a) sebesar $2,0-4,0 \times 10^7$ sel/ml. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa yang terlalu tinggi mengakibatkan terjadinya polispermi sehingga diduga menyebabkan abnormalitas embrio khususnya fragmentasi. Oleh karena itu, diperlukan konsentrasi spermatozoa yang tepat untuk mendapatkan hasil fertilisasi *in vitro* yang optimum.

Berikut ini disajikan gambar embrio yang mengalami degenerasi sebelum membelah (Gambar 4A) dan sesudah membelah (4B).



Gambar 4. Embrio yang mengalami degenerasi. Degenerasi embrio sebelum membelah (Gambar 4A) dan sesudah membelah (4B).
Keterangan : a. Badan polar, b. Oosit c. Zona pelusida, d. Blastomer (Perbesaran 40X10).

Pada penelitian ini ditemukan beberapa kejadian abnormalitas pada embrio yang berupa pembelahan asimetris, fragmentasi dan hilangnya zona pelusida. Abnormalitas embrio ini dapat menyebabkan kegagalan embrio dalam mencapai tahap perkembangan embrio lebih lanjut, sehingga diduga akan menyebabkan terjadinya peningkatan degenerasi embrio. Abnormalitas embrio khususnya fragmentasi dapat terjadi karena dua faktor yaitu, faktor eksogen yang berhubungan dengan perlakuan embrio dan kondisi kultur serta faktor endogen yang berhubungan dengan kualitas oosit, genotip parental atau genotip embrio (Hawes and Latham, 2000). Abnormalitas embrio juga dapat disebabkan kualitas oosit yang kurang baik yang dapat dipengaruhi oleh umur dari mencit betina yang digunakan untuk FIV. Jumlah embrio yang menunjukkan abnormalitas meningkat seiring dengan bertambahnya umur mencit betina (Sunarti dkk., 2000). Dalam penelitian ini kualitas oosit yang digunakan untuk FIV merupakan kualitas yang baik karena menurut penelitian Sunarti dkk. (2000) mencit betina yang mempunyai umur antara 2-6

bulan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dalam hal kualitas oosit. Abnormalitas embrio yang terjadi pada pene.....
diduga disebabkan karena konsentrasi spermatozoa yang terlalu tinggi dalam FIV.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan spermatozoa epididimis dan spermatozoa hasil kriopreservasi secara keseluruhan menunjukkan tingkat keberhasilan yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) masing-masing yaitu 2 sel sebesar 71,7794% dan 68,4181%, morula sebesar 52,6788% dan 53,3038%, keterlambatan perkembangan sebesar 47,3213% dan 46,6963% serta degenerasi sebesar 28,2206% dan 31,7306%.
2. Kejadian abnormalitas embrio yang ditemukan pada penelitian meliputi pembelahan asimetris, fragmentasi dan embrio tanpa zona pelusida yang mengurangi tingkat keberhasilan perkembangan embrio.

B. Saran

1. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk menguji penambahan glukosa pada setiap tahap perkembangan embrio mencit hasil fertilisasi *in vitro* sampai tahap perkembangan embrio lebih lanjut (blastosis).
2. Penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk mengetahui konsentrasi spermatozoa yang tepat digunakan dalam FIV pada mencit.
3. Penelitian selanjutnya juga diperlukan untuk mengevaluasi perkembangan embrio dengan menggunakan teknik pewarnaan histokimia.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M.R. 2000. Mekanisme Molekuler Proses Fertilisasi pada Hewan. *Hayati*. 7 (4): 117-120.
- Anderson, G.B. 1971. An Introduction to Embryology. Saunders Company. Philadelphia, London. Toronto.

- Anonim. 2004. Mice, Inbred Strain. <http://frend.hmc.psu.edu/ds/retrieve/ferd/meshdescriptor/D00881>. [14 Juli 2005].
- Austin, C. R. and Short, F. R. S. 1982. *Reproduction in Mammals Germ Cells and Fertilization*. Second Edition. Cambridge University Press, London. New York. Sydney.
- Balinsky, D. L. 1997. *An Introduction to Embryology*. Fifth Edition. W. B. Saunders Company. London.
- Bath, M.L. 2003. Simple and Efficient In Vitro Fertilization with Cryopreserved C57BL/6J Mouse Sperm. *Biolreprod*. 68 (1): 19-23.
- Bavers, M. M., S. J. Dieleman, R. Van den Hurk and F. Radyar. 1997. Regulation and Modulation of Oocytes Maturation in The Bovine. *Theriogenology*. 47: 12-21.
- Bavister, B.D. 1981. Analysis of Culture Media for In Vitro Fertilization and Criteria for Success. In L. Mastroianni Jr. and J. D. Biggers (Eds.). *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Plenum Press. New York.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1997. *Applied Animal Reproduction*. Prentice Hal. New Jersey.
- Biggers, J.D., B.D. Moore and D.G. Whittingham. 1965. Development of Mouse Embryo in vivo after Cultivation from Two-cell Ova to Blastocysts in vitro. *Nature*. 206: 734-735.
- Biggers, J. D. and J. R. L. Mastroianni. 1981. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Plenum Press. New York and London.
- Boediono, A. and Suzuki. 1996. In Vitro Development of Holstein and Japanese Black Breeds Embryo. *Media Veteriner*. 3: 3-9.
- Boediono, A., Y. Rusianto., K. Mohamad, I. Djuwita, dan Herliatien. 2000. Perkembangan Oosit Kambing Setelah Maturasi, Fertilisasi dan Kultur *In Vitro*. *Media Veteriner*. 7(4): 11 50
- Chang, M.C. 1973. Cultivation and Transplantation of Mammalian Eggs. In Hasegawa, T., Hayashi, M., Ebling, F.J.G. and Henderson, I.W. (Eds.) *Fertility and Sterility*. American Elsevier Publishing Co., Inc. New York.

- Choi, Y.H., F.C.L. Alvarenga, G.E. Seidel Jr., and E.L. Squires. 2003. Effect of Capacitation of Stallion Sperm with Polyvinylalcohol or Bovine Serum Albumin on Penetration of Bovine Zona-Free or Partially Zona-Removed Equine Oocytes. *Anim. Sci. J.* 81: 2080-2087.
- Djati, M.S. 2003. Diskursus Teknologi Embryonic Stem Cells dan Kloning dari Dimensi Bioetika dan Relegiositas. *Jurnal Universitas Paramadina.* 3 (1): 102-123.
- Djuwita, I., L. Amalia, Widjiati, dan K. Mohamad. 2000. Efek Konsentrasi Glukosa dalam Medium Dengan dan Tanpa Fosfat terhadap Perkembangan Embrio Preimplantasi Mencit secara *In vitro*. *Media Veteriner.* 7 (1): 9-12.
- Driancourt, M.A. and R.C. Fry. 1992. Effect of Superovulation with pFSH or PMSG on Growth and Maturation of Ovulatory Follicles in Sheep. *Animal Reprod. Sci.* 27: 279-292.
- Edwards, R.G. 1973. "Fertilization and Development of Preovulatory Human Oocytes In Vitro". In Hasegawa, T., Hayashi, M., Ebling, F.J.G. and Henderson, I.W. (Eds.) *Fertility and Sterility*. American Elsevier Publishing Co., Inc. New York.
- Fatchiyah, F.G. Ciptadi, M.S. Djati dan S. Wahyuningsih. 2000. Penambahan FBS dan EGS pada Media Kultur Maturasi In Vitro (IVM) Oosit Kambing Lokal PE. *Natural. J.* 4 (3): 52-55.
- Fibrianto, Y.H., D.L. Kusindarta dan S. Soebagyo. 2000. Penggunaan Serum Inaktivasi dari Rumah Potong Hewan pada Media Fertilisasi In Vitro. *Mediagama.* 2: 1-6.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak* (diterjemahkan oleh B. Srigandono dan Koen Praseno). Edisi Keempat. UGM Press. Yogyakarta.
- Gartner, L., J. L. Hi Att and J.M. Strum. 1988. *Histology*. William Wilkins Press. Baltimore, Hongkong, London, Sydney, USA.
- Gazali, M. dan S.N. Tambing. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati.* 9 (1): 27-32.
- Goenarso, 2004. Efek Gosipol terhadap Kontraksi Usus Halus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan Secara *In Vitro*. <http://digilib.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbpp-gd-jou-2004-Goenarso-1735>. [5 Juli 2005].

- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Biotechnology in Agriculture Series. CAB International.
- Goto, K., F. Takagi, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1986. In Vitro Fertilization and Development of Mouse Ova in Protein-Free Medium. *Anim. Reprod. J. Japan.* 3: 48-52.
- Gupta, R., K. Tyagi, S.K. Jain and S. Misra-Bhattacharya. 2003. Establishment In Inbred and Outbred Strains of Mice. *Exp. Parasitol.* 103 (1-2): 57-60.
- Harjanti, W. D. 2002. Perkembangan Inti Sel Telur dan Sperma Pasca Fertilisasi *In Vivo* dan Fertilisasi *In Vitro* pada Mencit (*Mus musculus albinus*). FKH IPB. Bogor. (Thesis)
- Hawes, S. M. and K. E. Latham. 2000. Effect of Paternal Genotype on Embryo Fragmentation at The 2 Cell Stage of Mouse Embryogenesis. Temple University School of Medicine. Philadelphia. [Abstract].
- Hogan, B., C. Frank and L. Elizabeth. 1986. *Manipulating The Mouse Embryo A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Hoshi, M. and Y. Toyoda. 1985. Effect of EDTA on The Preimplantation Development of Mouse Embryos Fertilized In Vitro. *J. Zootech. Sci.* 56 (12): 931-937.
- Jacoby, W. B. 1993. Cell Culture. Academic Press. Inc. London.
- Johnson, M. and B. Everitt. 1988. Essential Reproduction. Third Edition. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Junqueira, L.C., J. Carneiro, R.O. Kelley. 1998. *Histologi Dasar* (diterjemahkan oleh Jan Tambayong). Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kaiin, E.M. dan B. Tappa. 1994. Perkembangan Embrio *In Vitro* mencapai Hatched Blastosis pada Kondisi Media yang Berbeda. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bioteknologi II*. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor
- Kawase, Y., T. Iwata, O. Ueda, N. Kamada, T. Tachibe, Y. Aoki, K. Jishage and H. Suzuki. 2002. Effect of Partial Incision of the Zona Pellucida by Piezo-Micromanipulator for In Vitro Fertilization Using Frozen-Thawed Mouse Spermatozoa on the Developmental Rate of Embryos Transferred at the 2-Cell Stage. *Biology of Reprod.* 66: 381-385.

- Knobil, C. and J.D. Neill. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Vol.1. Raven Press. New York.
- Kuzakabe, H., M. A., Szczygiel, D. G. Whittingham, and R. Yanagimachi. 2001. Maintenance of Genetic Integrity in Frozen and Freeze-Dried Mouse Spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(24): 13501-13506.
- Kuzan, J.W. and R.W. Wright. 1986. Observation on The Development Morulae on Various Cellular and Non Cellular. *Animal Sci. J.* 54 : 811.
- Leeson, C.R., T.S. Leeson dan A.A. Paparo. 1996. *Histologi* (diterjemahkan oleh Jan Tambayong dan Sugito Wonodirekso). Edisi Kelima. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Madison, V., B. Avery and T. Greve. 1992. Selection of Immature Bovine Oocytes for Developmental Potential in vitro. *Animal Reproduction Sci.* 27: 1-11.
- Margawati, E.T., E. M. Kaiin, K. Eriani, N. D. Yanthi dan Indriawati. 2000. Pengaruh Media IVM dan IVC pada Perkembangan Embrio Sapi secara *In Vitro*. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner.* 5(4): 229-233.
- Miyoshi, K., H., Funahashi, K. Okuda, and K. Niwa. 1994. Development of Rat One-Cell Embryos in A Chemically Defined Medium: Effect of Glucose, Phosphat and Osmolarity. *J. Reprod. and Fertil.* 100: 21-26.
- Mohamad, K., K. Budiarta, I.K.M. Adnyane, I. Djuwita dan A. Boediono. 2003. Siklus Estrus dan Bobot Uterus setelah Autotransplantasi Ovari secara Subkutan pada Mencit yang Diberi atau Tanpa Superovulasi. *Hayati.* 10 (3): 100-105.
- Nagai, T. 1996. In Vitro Maturation and Fertilization of Pig Oocyte. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 153-163.
- Nakagata, N., M. Okamoto, O. Ueda, and H. Suzuki. 1997. Positive Effect of Partial Zona-Pellucida Dissection on The In Vitro Fertilizing Capacity of Cryopreserved C57BL/6J Transgenic Mouse Spermatozoa of Low Motility. *Biology of Reprod.* 57: 1050-1055
- Nakagata, N. 2000. Mouse Spermatozoa Cryopreservation. *Mamm. Ova Reprod. J.* 17: 1-8.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas*. Edisi Ketiga. UI Press. Jakarta.

- Parera, F., Ismaya dan Kustono. 2000. Pengaruh Pencucian Sperma dan Aras Kuning Telur terhadap Kualitas Sperma Beku Kambing Peranakan Ettawa. *Agrosains*. 13 (1): 92-103.
- Permana, S., A.M.W. Pramana, A. Soewondo, M.S. Djati, M. Rifai dan B. Samitro. 2000. Motilitas dan Kapasitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus sp*) dalam Saluran Reproduksi Betina. *Natural. J.* 3 (2): 1-6.
- Putro, P.P. 1993. *Petunjuk Laboratorium Fertilisasi In Vitro*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. UGM. Yogyakarta.
- Rothschild, L. 1956. *Fertilization*. Methuen & Co. Ltd. London
- Rugh, R. 1967. *The Mouse Its Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company. Minneapolis.
- Sagi, M. 1999. *Embriologi Perbandingan pada Vertebrata*. Fajar Offset. Yogyakarta.
- Said, S., T. Saili dan B. Tappa. 2003. Pengaktifan dan Pembuahan Sel Telur Tikus setelah Disuntik dengan Kepala Spermatozoa. *Hayati*. 10 (3) : 96-99.
- Salisbury, G.W. dan N.L. VanDemark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi* (diterjemahkan oleh R. Djanuar). UGM Press. Yogyakarta.
- Santiago, C.L. and Marzluff. 1989. *The Molecular Biology of Fertilization: Changes In Gene Activity Early After Fertilization*. Academic Press. USA
- Sirard, M.A. and P. Blondin. 1996. Oocyte Maturation and IVF in Cattle. *Animal Reprod. Sci.* 42: 417-426.
- Smith, J.B dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. UI Press. Jakarta.
- Sukra, Y. 2000. *Wawasan Ilmu Pengetahuan Embrio Benih Masa Depan*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Sunarti, I. Djuwita dan Y. Sukra. 2000. Pengaruh Umur Induk terhadap Perkembangan Embrio Secara *In Vitro* pada Mencit Superovulasi. *Media Veteriner*. 7(4): 18-21.
- Suzuki, T., C. Sumantri, N. H. A. Khan, and M. Murakami, S. Saha. 1999. Development of a Simple, Portable Carbon Dioxide Incubator for In Vitro Production of Bovine Embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 149-157.

- Supriatna, I. dan F.H. Pasaribu. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Depdikbud. Dirjen. Pend. Tinggi, Pusat Antar Universitas Biotek. IPB. Bogor.
- Susilowati, T., S.B. Sumitro, M.S. Djati, G. Ciptadi. dan B. Permono. 1998. Optimalisasi Maturasi Oosit secara In Vitro dengan Kombinasi Konsentrasi Serum dan Hormon pada TCM 199. *Natural. J. 2* (1): 16-23.
- Szczygiel, M.A., H. Kusakabe, R. Yanagimachi and D.G. Whittingham. 2002a. Separation of Motil Populations of Spermatozoa Prior to Freezing is Beneficial for Subsequend Fertilization In Vitro: A Study with Various Mouse Strains. *Biology of Reprod.* 67: 287-292.
- Szczygiel, M.A., H. Kusakabe, R. Yanagimachi and D.G. Whittingham. 2002b. Intracytoplasmic Sperm Injection Is More Efficient than In Vitro Fertilization for Generating Mouse Embryos from Cryopreserved Spermatozoa. *Biology of Reprod.* 67: 1278-1284.
- Sztejn, J.M., J.S. Farley and L.E. Mobraaten. 2000. In Vitro Fertilization With Cryopreserved Inbred Mouse Sperm. *Biology of Reprod.* 63: 1774-1780.
- Takahashi, Y., M. Hishinuma, M. Matsui, H. Tanaka, and H. Kanagawa. 1996. Development of In Vitro Matured/Fertilized Bovine Embyos in a Chemically Defined Medium: Influence of Oxygen Concentration in The Gas Atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* 58(9): 897-902.
- Taya, K., H. Kaneko, T. Takedomi, H. Kishi and G. Watanabe. 1996. Role of Inhibin in The Regulation of FSH Secretion and Folliculogenesis in Cow. *An. Reprod. Sci.*, 42: 563-570.
- Toelihere, M.R. 1979. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Triwulaningsih, E., A. Lubis, P., Situmorang. 1994. Pengaruh Jenis Serum dan "Tuba Falopii Cell Monolayer" Untuk Memproduksi Embrio Secara *In Vitro*. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor.
- Turner, C.D. dan J.T. Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum*. Edisi Keempat. Airlangga University Press. Surabaya.
- Uranga, J. A. and Arechaga, J. 1997. Analyse Comparative du Development In Vitro d'embryons de Souris non Consanguines. *Reprod. Nutr. Dev.* 37: 41-49.

- Villee, C.A., F.W. Warren and D.B. Robert. 1988. *Zoologi Umum* (diterjemahkan oleh Nawangsari Sugiri). Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
- Wakayama, T. and R. Yanagimachi. 1998. Development of Normal Mice from Oocytes Injected with Freeze- Dried Spermatozoa. *Nature Biotech.* 16: 639-640.
- Wales, R. G. 1969. Effect of Ions on The Development of Mouse Embryos *In Vitro*. *J. Bio.Sci.* 23: 421-429.
- Wildt, D. E. 1986. Spermatozoa. In R. Duhelow and J. Erwin (Eds.) *Comparative Primate Biology*. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Wilmot, I., C. S. Haley and J. A. Woolliams. 1992. Impact of Biotechnology on Animal Breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 149-162.
- Wu, J., B.R. Emery and D.T. Carrell. 2001. In Vitro Growth, Maturation, Fertilization, and Embryonic Development of Oocytes from Porcine Preantral Follicles. *Biology of Reprod.* 64: 375-381.
- Xu, K., Z. M. Shi, L. L. Veeck, M. R. Hughes, Z. Rosenwaks. 1999. First Unaffected Pregnancy Using Preimplantation Genetic Diagnosis for Sickle Cell Anemia. *J. Med. Ass.* 281: 1701-1706.
- Yulnawati. 2006. Optimalisasi Produksi Embrio Domba secara *In Vitro*: Penggunaan Medium CR1aa dan Pengaruh Status Reproduksi Ovarium. FKH IPB. E (Thesis)

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Medium HTF (*Human Tubal Fluid*)

Table 2. Komposisi Medium HTF bersumber pada Nakagata (2000).

Komponen	Konsentrasi (mg/100ml)
NaCl	593,8
KCl	35,0

MgSO ₄ . 7H ₂ O	4,9
KH ₂ PO ₄	5,4
CaCl ₂ . 2H ₂ O	29,8
NaHCO ₃	210,0
Glukosa	50,0
Na-Piruvat	3,7
Na-Laktat	0,34 ml
Penicilin G	100 U/ml
Sterptomisin	50 µg/ml
BSA	4 mg/ml
0.5% Phenol red	0,04 ml

Lampiran 2. Komposisi Medium CZB (*Chatot Ziomek Bavister*)

Tabel 3. Komposisi Medium CZB bersu 60 da Uranga and Arechaga (1997).

Bahan	Konsentrasi
-------	-------------

	(gr/l)
NaCl	4,711
KCl	0,360
KH ₂ PO ₄	0,161
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,291
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,250
NaHCO ₃	2,111
Glukosa	1,102
Na-Laktat	3,507=0,544
Na-Piruvat	0,030
Glutamin	0,1461
BSA	5,000
EDTA	0,041

Lampiran 3. Cara Kriopreservasi Spermatozoa

Cara kerja kriopreservasi spermatozoa berdasarkan modifikasi dari Nakagata (2000) meliputi:

1. Pembuatan *Cryopreservation Solution* (CPS)

Skim milk 0,6 gr dilarutkan dalam 20 ml aquabides kemudian dipanaskan selama 10 menit. Larutan susu tersebut didinginkan sampai suhu 60 °C kemudian diambil 5 ml dan dicampurkan dengan 0,9 gr rafinosa. Larutan CPS yang telah tercampur dimasukkan ke dalam tabung eppendorf lalu disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 27 °C sebanyak 2 kali sampai larutan CPS menjadi bening. CPS yang telah jadi ditambahkan 10 µl penstrep dan diukur pHnya (pH netral).

2. Prosedur Pembekuan Spermatozoa Epididimis

Mencit jantan yang telah dewasa (3-6 bulan) dibedah. Koleksi spermatozoa diambil dari 2 kauda epididimis dengan cara menoreh kauda epididimis tersebut dalam 200 µl CPS. *Syringe* berukuran 0,5 ml dihubungkan dengan *straw* kemudian 100 µl medium HTF, 10 µl udara dan 10 µl suspensi spermatozoa dimasukkan secara berturut-turut ke dalam *straw* dengan disedot menggunakan *syringe* sampai medium HTF menyentuh sumbat pada salah satu sisi *straw* dan sisi yang lain disegel dengan *sealer*. Sepuluh sample *straw* disusun di atas rak dinamis Puslit Bioteknologi LIPI secara horizontal lalu diapungkan di atas nitrogen cair dengan ketinggian 6 cm di atas

permukaan nitrogen cair selama 10 menit (suhu -40°C). Setelah 10 menit, *straw*

Ulangan	Spermatozoa Epididimis								Spermatozoa Has			
	2 sel		Morula		Keterlambatan perkembangan		Degenerasi		2 sel		Morula	
	Jumlah embrio	Persentase (%)	Jumlah embrio	Persentase (%)	Jumlah embrio	Persentase (%)	Jumlah embrio	Persentase (%)	Jumlah embrio	Persentase (%)	Jumlah embrio	Persentase (%)
1	5	71.43%	3	60.00%	2	40.00%	2	28.57%	3	50.00%	2	66.67%
2	6	66.67%	3	50.00%	3	50.00%	3	33.33%	6	85.71%	2	33.33%
3	8	80.00%	4	50.00%	4	50.00%	2	20.00%	7	77.78%	3	42.86%
4	4	66.67%	2	50.00%	2	50.00%	2	33.33%	4	66.67%	2	50.00%
5	5	83.33%	2	40.00%	3	50.00%	1	16.67%	3	60.00%	2	66.67%
6	7	70.00%	3	42.86%	4	57.14%	3	30.00%	4	80.00%	2	50.00%
7	4	66.67%	2	50.00%	2	50.00%	2	33.33%	5	71.43%	3	60.00%
8	5	83.33%	3	60.00%	2	40.00%	1	16.67%	4	80.00%	2	50.00%
9	6	75.00%	3	50.00%	3	50.00%	2	25.00%	3	60.00%	1	33.33%
10	4	66.67%	2	50.00%	2	50.00%	2	33.33%	5	62.50%	2	40.00%
11	4	66.67%	3	75.00%	1	25.00%	2	33.33%	5	62.50%	4	80.00%
12	5	71.43%	2	40.00%	3	60.00%	2	28.57%	5	71.43%	3	60.00%
13	4	66.67%	2	50.00%	2	50.00%	2	33.33%	4	57.14%	2	50.00%
14	4	80.00%	3	75.00%	1	25.00%	1	20.00%	5	71.43%	3	60.00%
15	5	71.43%	2	40.00%	3	60.00%	2	28.57%	4	66.67%	2	50.00%
16	5	62.50%	3	60.00%	2	40.00%	3	37.50%	5	71.43%	3	60.00%
Rata-rata (%)	-	71.7794	-	52.6788	-	46.6963	-	31.7306	-	68,4181	-	53.3038

dimasukkan ke dalam nitrogen cair menggunakan kanister dan penjepit. *Straw* yang telah beku disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk dapat digunakan lagi dalam FIV atau keperluan lain.

Lampiran 4. Persentase Perkembangan Embrio Hasil FIV

Tabel 4. Persentase Perkembangan Embrio Hasil FIV

Jumlah total embrio	81	-	42	-	39	-	32	-	72	-	38	-
---------------------	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---

Lampiran 5. Analisis Paired Samples T-Test Embrio Tahap 2 Sel

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
--	------	---	----------------	-----------------

Pair	Epididimis	71,7794	16	6,62640	1,65660
Kriopreservasi	1	68,4181	16	9,57612	2,39403

Paired Samples Correlations

Pair	N	Correlation	Sig.
1 Epididimis & Kriopreservasi	16	,097	,722

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
1 Pair Epididimis Kriopreservasi	3,36125	11,10678	2,77669	-2,55714	9,27964	1,211	15	,245

Lampiran 6. Analisis Samples T-Test Embrio Tahap Morula

Paired Samples Statistics

Pair	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
1 Epididimis	52,6788	16	10,91228	2,72807
Kriopreservasi	53,3038	16	12,61718	3,15430

Paired Samples Correlations

Pair	N	Correlation	Sig.
1 Epididimis & Kriopreservasi	16	,416	,109

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Epididimis Kriopreservasi	-.62500	12,79913	3,19978	-7,44517	6,19517	-,195	15	,848

Lampiran 7. Analisis Samples T-Test Keterlambatan Perkembangan

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Epididimis Kriopreservasi	47,3213	16	10,91228	2,72807
	46,6963	16	12,61718	3,15430

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Epididimis & Kriopreservasi	16	,416	,109

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Epididimis Kriopreservasi	-.62500	12,79913	3,19978	-6,19517	7,44517	-,195	15	,848

Lampiran 8. Analisis Samples T-Test Embrio Degenerasi

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Epididimis	28,2206	16	6,62640	1,65660
Kriopreservasi	31,7306	16	9,30424	2,32606

Paired Samples Correlations

Pair	N	Correlation	Sig.
1 Epididimis & Kriopreservasi	16	,113	,678

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Epididimis Kriopreservasi	-3,51000	10,79842	2,69961	-9,26407	2,24407	-1,300	15	,213