

**TINGKAT FERTILISASI OOSIT SAPI BALI YANG
DIBEKUKAN MENGGUNAKAN KRIOPROTEKTAN
BERBEDA**

SKRIPSI

**NURUL AHMAD RIDWAN DM
I 111 15 507**



**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**TINGKAT FERTILISASI OOSIT SAPI BALI YANG
DIBEKUKAN MENGGUNAKAN KRIOPROTEKTAN
BERBEDA**

SKRIPSI

**NURUL AHMAD RIDWAN DM
I 111 15 507**

**Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Peternakan
pada Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Ahmad Ridwan DM

NIM : I 111 15 507

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis dengan judul: **Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Bali yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Berbeda** adalah Asli

Apabila sebagian atau seluruhnya dari karya skripsi ini tidak asli atau plagiasi maka saya bersedia dibatalkan dikenakan sanksi akademik sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Makassar, November 2020

Peneliti

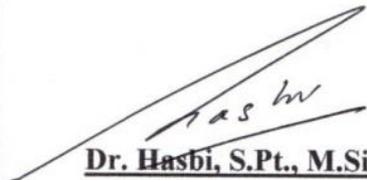


Nurul Ahmad Ridwan DM

HALAMAN PENGESAHAN

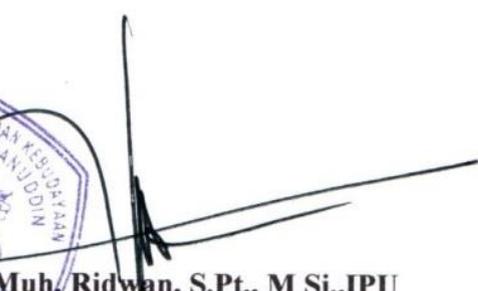
Judul Penelitian : Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Bali yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Berbeda
Nama : Nurul Ahmad Ridwan DM
NIM : I111 15 507

Skripsi ini Telah Diperiksa dan Disetujui Oleh :


Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si
Pembimbing Utama


Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA., DES
Pembimbing Anggota




Dr. Ir. Muh. Ridwan, S.Pt., M Si., IPU
Ketua Program Studi

Tanggal Lulus : 18 November 2020

ABSTRAK

NURUL AHMAD RIDWAN DM I111 15 507. Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Bali yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Berbeda. Dibimbing Oleh: **Hasbi dan Herry Sonjaya**

Selama proses kriopreservasi, oosit mengalami cekaman dingin dan pembentukan Kristal es yang menyebabkan kerusakan sel oosit. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat fertilisasi oosit sapi bali yang menggunakan krioprotektan berbeda. Koleksi oosit berasal dari ovarium sapi Bali betina yang disembelih yang selanjutnya dicacah, diseleksi dan dikriopreservasi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan yakni kontrol, DMSO 15%, EG 30%, dan kombinasi DMSO 15+EG 30% dan 4 ulangan. Parameter yang diamati pada tahap tingkat maturasi: *germinal vesicle*, *germinal vesicle break down*, *metaphase-I* dan *metaphase-II*, dan tingkat fertilisasi. Hasil penelitian menunjukkan tahap pematangan GV , GVBD dan M-I lebih tinggi pada perlakuan DMSO 15%, EG 30%, dan kombinasi DMSO 15%+EG 30% dibanding perlakuan kontrol tetapi tahap MII rendah. Tingkat fertilisasi pada perlakuan DMSO 15%, EG 30%, dan kombinasi DMSO 15+EG 30% lebih rendah dibanding kontrol. Penelitian ini menyimpulkan bahwa Pembekuan dengan menggunakan krioprotektan DMSO, EG dan kombinasi DMSO+EG menurunkan jumlah oosit yang mencapai tahap MIL., namun masih dapat terfertilisasi meskipun hasilnya lebih rendah dibandingkan tanpa proses pembekuan.

Kata kunci: *Oosit, DMSO, EG, Maturasi, Fertilisasi., Sapi Bali.*

ABSTRACT

NURUL AHMAD RIDWAN DM I111 15 507. Fertilization Rate of frozen Bali cattle oocytes using different cryoprotectans. Supervised by: **Hasbi** and **Herry Sonjaya**.

During the cryopreservation process, the oocytes suffered from cold shock and ice crystal formation that possibly causes oocytes cell damage, therefore, this study aimed to determine fertilization rate of frozen Bali cattle oocytes using different cryoprotectans. Oocytes were collected from ovarium of slaughtered Bali cows, then slicing, selection, and cryopreserved: This study used Completely Randomized Design (RAL) with control, DMSO 15%, EG 30%, and combination of DMSO 15+EG 30% and 4 replications. Parameters observed at the maturation stage: germinal vesicle, germinal vesicle break down, metaphase-I and metaphase-II, and fertilization. The results showed that the maturation stage of GV, GVBD and M-I was significantly higher at DMSO 15%, EG 30%, and combination DMSO 15+EG 30% treatment compared to control, but metaphase II lower. Fertilization stage was significantly lower at DMSO 15%, EG 30%, and combination of DMSO 15+EG 30% compared to control was significantly lower in control treatment. The study concluded that cryoprotectan treatment DMSO, EG and combination DMSO+EG oocytes lowered the rate maturation in MII and frozen oocytes but can still be fertilized and fertilize despite severe result without freezing process.

Keywords: *Oocytes, DMSO, EG, maturation, fertilization., Bali Cattle*

KATA PENGANTAR



Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kepada Allah ta'ala yang masih memberikan limpahan rahmat sehingga penulis tetap dapat menjalankan aktivitas sebagaimana mestinya, serta kami haturkan salawat dan salam kepada junjungan baginda Nabi Muhammad sallallahu'alaihi wasallam, keluarga dan para sahabat, yang telah memimpin umat islam dari jalan jahilia menuju jalan Addinnul islam yang penuh dengan cahaya kesempurnaan.

Limpahkan rasa hormat, kasih sayang, cinta dan terima kasih tiada tara kepada Ayahanda **Ridwan Badullah** dan Ibunda **ST. Rabiah** yang telah mendidik dan membesarkan dengan penuh cinta dan kasih sayang yang begitu tulus serta senantiasa memanjatkan do'a dalam kehidupannya untuk keberhasilan penulis. **Nurul Fitrawati Ridwan** dan **Nurul Isra Ridwan** yang telah menjadi saudari yang sangat baik bagi penulis, yang senantiasa memberi dukungan moril. sangat baik bagi penulis, yang senantiasa memberi dukungan moril dan materil , terimakasih atas segala bantuan, dan dukungan, semoga Allah senantiasa melindunginya dan mengumpulkan keluarga kami dalam surganya.

Ucapan terimakasih yang tak terhingga penulis haturkan kepada bapak **Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si** selaku pembimbing utama dan kepada bapak **Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES , DEA** selaku pembimbing anggota terima kasih atas didikan, bimbingan, serta waktu yang telah diluangkan untuk memberikan petunjuk dan menyumbangkan pikirannya dalam membimbing penulis mulai dari

perencanaan penelitian sampai selesainya skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis haturkan dengan segala keikhlasan dan kerendahan hati kepada:

1. **Rektor Unhas Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A, Dekan Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc, Wakil Dekan dan seluruh Bapak Ibu Dosen yang telah melimpahkan ilmunya kepada penulis, dan Bapak Ibu Staf Pegawai Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.**
2. Kepada bapak **Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Toleng, M.Sc** dan ibu **Prof. Rr. Sri Rachma A. Bugiwati, M.Sc., Ph.D** selaku pembahas yang telah banyak memberikan saran, masukan dan nasehat bagi penulis untuk perbaikan tugas akhir ini.
3. **Dosen** Pengajar Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin yang telah banyak memberi ilmu yang sangat bernilai bagi penulis.
4. **Prof. Prof. Rr. Sri Rachma A. Bugiwati, M.Sc., Ph.D** selaku penasehat akademik yang banyak meluangkan waktu untuk memberikan motivasi, nasehat dan dukungan kepada penulis.
5. Teman - teman "**Rantai 2015**" yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah menemani dan mendukung penulis selama kuliah. Terima kasih atas segala waktu dan kebersamaannya.
6. Teman-teman penelitian **Andi Arya Pawarekki** dan kakak **Erni Damayanti S.Pt** yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian.

Dengan penuh syukur, penulis menyadari bahwa skripsi ini kurang dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik serta saran pembaca sangat diharapkan dan pada penelitian selanjutnya dapat dikembangkan dikemudian hari, demi

perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan nantinya. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi kita semua. Aamiin Ya Robbal Aalamin. Akhir Qalam *Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*.

Makassar, November 2020



Nurul Ahmad Ridwan DM

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Tujuan dan Kegunaan.....	3
TINJAUAN PUSTAKA	
Ovarium.....	4
Folikulogenesis	5
Oogenesis	6
Pematangan In Vitro.....	7
Fertilisasi In Vitro.....	8
Kriopreservasi dan Krioprotektan.....	9
Hipotesis	11
METODE PENELITIAN	
Waktu dan Tempat	12
Materi Penelitian.....	12
Rancangan Penelitian.....	12
Prosedur Penelitian	13
Koleksi dan Seleksi Oosit.....	13
Kriopreservasi dan <i>Thawing</i>	14
Pematangan Oosit In Vitro	14
Fertilisasi Oosit In Vitro	15
Fiksasi.....	15
Parameter Penelitian	16
Tingkat Pematangan Inti	16
Tingkat Fertilisasi	16
Analisis Data.....	16

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Morfologi Oosit Sapi Bali Segar dan Oosit Setelah Kriopreservasi.....	18
Tingkat Maturasi Oosit Sapi Bali yang Dibekukan menggunakan Krioprotektan Berbeda.....	19
Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Bali yang Dibekukan menggunakan Krioprotektan Berbeda.....	22

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan	26
Saran	26

DAFTAR PUSTAKA	27
----------------------	----

LAMPIRAN

RIWAYAT HIDUP

DAFTAR TABEL

No.	Teks	Halaman
1.	Tabel 1. Persentase pematangan oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan krioprotektan berbeda.....	21
2.	Tabel 2. Tingkat fertilisasi oosit pada penggunaan krioprotektan yang berbeda.....	24

DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	Gambar 1. Oosit Segar dan Oosit setelah proses kriopreservasi.....	18
2.	Gambar 2. Status inti Oosit.....	20
3.	Gambar 3. Oosit 2 Pronekleus.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Teks	Halaman
1.	Komposisi Media Maturasi Secara <i>In Vitro</i>	31
2.	Komposisi Media Fertilisasi Secara <i>In Vitro</i>	31
3.	Data Transformasi Penelitian.....	32
4.	Hasil Uji Statistik Tingkat Pematangan Inti.....	32
5.	Hasil Uji Statistik Fertilisasi.....	36
6.	Dokumentasi.....	37

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Peternakan di Indonesia adalah jenis peternakan tradisional yang bersifat konvensional sehingga menyebabkan jumlah ternak tidak memenuhi kebutuhan masyarakat terhadap konsumsi daging sapi. Permintaan daging sapi nasional meningkat dari tahun ke tahun, konsumsi daging sapi per kapita tahun 2017 sebesar 0,469 kg, atau meningkat sebesar 12,50% dari konsumsi daging sapi per kapita tahun 2016 sebesar 0,417 kg. Pada tahun 2017 rata-rata produksi daging sapi mencapai mencapai 486.302 ton yang berasal dari sapi lokal dan sapi impor mencapai 28.638 ton (Kementerian Pertanian, 2018).

Permintaan daging yang terus meningkat menyebabkan terjadi pemotongan sapi betina produktif karena memiliki produktivitas daging yang lebih banyak dan harga yang murah dibanding sapi jantan. Pemotongan betina produktif dalam negeri sudah tidak dapat dihindarkan lagi. Pemotongan sapi di Sulsel sekitar 140 ribu ekor per tahun, dan berdasarkan data 80 persennya adalah sapi betina produktif, atau artinya ada sekitar 112 ribu sapi betina yang dipotong setiap tahun (Dinas PKH Sulawesi Selatan, 2018).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut yaitu dengan memanfaatkan teknologi fertilisasi secara in vitro (FIV). Teknologi FIV dapat menggunakan limbah ovarium dari hasil pemotongan betina produktif yang cukup berlimpah, jika tidak segera ditangani maka setelah kematian hewan, ovarium akan kehilangan suplai oksigen dan energi akibat dari terputusnya aliran darah dan ovarium akan berada pada kondisi *ischemia* (Lopes *et al.*, 2009).

Untuk meningkatkan nilai tambah oosit sehingga dapat dipergunakan tanpa dibatasi oleh kendala waktu dan jarak melalui metode kriopreservasi. Teknik kriopreservasi oosit merupakan suatu cara untuk menyimpan sampel dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin dan mempertahankan kelangsungan hidup sel (Djuwita, 2001).

Proses kriopreservasi oosit pada mamalia sampai saat ini dilakukan dengan dua cara yaitu pembekuan lambat (*slow rate freezing*) dan vitrifikasi (*rapid freezing*). *Slow rate freezing* merupakan cara penyimpanan oosit dalam keadaan beku pada temperatur rendah dengan meminimalkan pembentukan kristal es intraselular, sedangkan vitrifikasi cara penyimpanan oosit tanpa adanya pembentukan kristal es, pembentukan es kristal akan menyebabkan kerusakan intraselular saat pembekuan (Liebermann *et al.*, 2002).

Kristal es yang terbentuk akan merusak struktur terutama membran plasma dan mitokondria (Lemma, 2011). Untuk mencegah terbentuknya kristal es selama proses pembekuan dapat dilakukan penambahan zat pelindung atau krioprotektan. Krioprotektan adalah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Jenis-jenis krioprotektan antara lain etilen glikol, dimethyl sulfoxide, dan gliserol (Saha *et al.*, 1995). Efektivitas berbagai jenis krioprotektan untuk pembekuan oosit sapi Bali datanya masih terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian ini.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh penggunaan konsentrasi krioprotektan etilen glikol dan *Dimethyl Sulfoxide* terhadap tingkat keberhasilan fertilisasi oosit sapi Bali.

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada peneliti dan pembaca tentang pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol dan *Dimethyl Sulfoxide* terhadap tingkat fertilisasi oosit sapi Bali.

TINJAUAN PUSTAKA

Ovarium

Ovarium merupakan organ reproduksi utama pada ternak betina. Bentuk dan ukuran ovarium berbeda-beda berdasarkan spesies hewan, umur, dan status reproduksi struktur yang berada didalamnya, pada sapi ovarium berbentuk oval dan bervariasi dalam ukuran, panjang dan lebar. Ovarium sapi terbagi atas dua yaitu ovarium kiri dan ovarium kanan. Ovarium kanan dan kiri memiliki perbedaan aktivitas (Sobari *et al.*, 2012).

Secara normal ovarium terletak di perbatasan kranial ligamentum lata uteri pada rantai ventrolateral pelvis dekat gerbang dalam pelvis. Ovarium terletak pada kantong yang dibentuk oleh ligament utero-ovarica dan mesovarium yang disebut bursa *ovary*. Umumnya ovarium bertaut pada mesovarium dan bagian ovarium yang tidak bertaut pada mesovarium menonjol pada cavum abdomen dan di permukaan inilah folikel menonjol keluar (Ismudiono *et al.*, 2010).

Ukuran ovarium tidak mempengaruhi jumlah oosit yang dihasilkan, namun jumlah dan kualitas oosit dipengaruhi oleh jumlah folikel yang terdapat pada ovarium (Gordon, 2003). Folikel dengan ukuran sedang 3-6 mm menghasilkan kualitas oosit yang baik dari folikel ukuran sedang, hal ini disebabkan karena meningkatnya kualitas oosit pada folikel besar oleh lingkungan intrafolikuler yang dapat memperbaiki kualitas oosit. Lingkungan intrafolikular mengandung hormon steroid dan peptida, faktor-faktor pertumbuhan, sitokin, dan molekul-molekul lain yang mempengaruhi oosit dan perkembangan folikel (Martino *et al.*, 1994)

Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses pematangan folikel pada korteks ovarium yang mencakup beberapa proses yaitu rekrutmen, seleksi, pertumbuhan, pematangan dan ovulasi (Campbell *et al.*, 2010). Peran utama pematangan folikel adalah untuk menghasilkan sejumlah oosit melalui proses oogenesis (Speroff *et al.*, 2010).

Fase folikular dimulai dengan penghilangan efek negatif dari progesteron sehingga konsentrasi GnRH meningkat. Peningkatan konsentrasi GnRH akan menyebabkan peningkatan produksi FSH dan (*Luteinizing Hormone*)LH sehingga dapat mendukung pertumbuhan folikel. Folikel de Graaf akan menghasilkan lebih banyak estrogen. Jika estrogen telah mencapai kadar maksimal, maka akan memicu pengeluaran LH sehingga terjadi ovulasi. Pada fase luteal, konsentrasi LH tidak mencapai kadar maksimal, akan mengalami regresi dan penurunan sekresi estrogen dan inhibin menyebabkan terbentuknya gelombang folikel baru. Folikel dominan mengandung estrogen dan inhibin dengan konsentrasi tinggi berhubungan dengan penekanan konsentrasi FSH di dalam sirkulasi darah (Maidaswar, 2007).

Luteinizing Hormone dari kelenjar pituitari mengarahkan luteinisasi dan menstimulasi sel granulosa untuk menghasilkan progesteron. Sel granulosa berproliferasi membesar dan berubah menjadi sel granulosa lutein. kumpulan lipid berpigmen kuning (lutein) dan lipid-lipid lainnya menandai perubahan menjadi sel granulosa lutein. Folikel dominan tidak akan dapat diovulasikan pada fase luteal akibat adanya CL yang mensekresikan progesteron dan terbatasnya frekuensi LH sehingga terjadilah atresi folikel dominan tersebut. Folikel besar yang muncul

pada saat luteolisis akan menjadi folikel dominan dan selanjutnya mengalami ovulasi pada fase folikuler (Inskeep, 2004).

Oogenesis

Oogenesis adalah proses pembentukan sel telur (ovum) yang terjadi di ovarium. Oogenesis diawali dengan pembentukan bakal sel-sel telur yang disebut oogonia tetapi pada oogonium proses mitosisnya telah terjadi sebelum dilahirkan. Setelah lahir, pada ovarium terdapat sekitar 400.000 oosit primer yang siap memasuki tahap meiosis (Firmansyah, dkk, 2007). Pertumbuhan oosit terdiri dari peningkatan diameter oosit, penambahan ukuran dari organel-organel, dan disertai dengan perkembangan pada inti dan sitoplasma (Telfer dan Sharpley, 2008).

Proses oogenesis terdiri dari beberapa tahap yaitu oogonium mengalami pembelahan mitosis berubah menjadi oosit primer. Oosit primer melakukan meiosis (tahap I), yang menghasilkan dua sel anak yang ukurannya tidak sama. Sel anak yang lebih besar adalah oosit sekunder yang bersifat haploid (n). Ukurannya lebih besar dari yang lain karena berisi lebih banyak sitoplasma dari oosit primer yang lain. Sel anak yang lebih kecil disebut badan kutub (*polar body*) pertama yang kemudian membelah lagi (Sonjaya *et al.*, 2016).

Proses penyelesaian pembelahan meiosis pada ovum akan terjadi jika ada rangsang berupa pemasukan sperma ke ovum. Jadi, meiosis tahap dua baru terselesaikan pada saat sperma masuk kedalam ovum, tepatnya ketika inti sperma baru sampai di sitoplasma, sebelum terjadi pertemuan antara inti sperma dan ovum. Pada saat sperma bertemu dengan inti ovum, pembelahan sperma tahap dua sudah berlangsung sehingga ovum benar-benar telah menjadi ovum haploid dan telah siap dibuahi (Isnaeni, 2006).

Pematangan In Vitro.

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

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

Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke metafase II (MII). Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk *germinal vesicle* (GV) dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Setelah *germinal vesicle breakdown* (GVBD) terjadi, kromosom dibungkus oleh mikrotubulus dan mikrofilamen yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami *germinal vesicle breakdown* (GVBD) selanjutnya akan mencapai tahap metafase I (MI) dan berakhir pada tahap metafase II (MII). Oosit yang berada pada tahap metafase II (MII) merupakan oosit yang telah matang dan siap untuk dilakukan fertilisasi (Widyastuti, 2015)

Fertilisasi In Vitro

Fertilisasi merupakan proses kompleks yang menghasilkan penggabungan dua gamet, penataan ulang jumlah kromosom dan dimulainya perkembangan individu baru. Proses fertilisasi hanya dapat terjadi setelah didahului proses kapasitasasi spermatozoa (Gordon, 2003). Fertilisasi dapat terjadi secara alami dan secara buatan melalui teknologi fertilisasi in vitro (Wahjuningsih, 2013). Teknik fertilisasi *in vitro* dapat menggunakan oosit yang berasal dari hewan yang masih hidup maupun dari oosit hewan yang telah dipotong, sehingga teknik fertilisasi *in vitro* ini dapat menjadi alternatif produksi embrio dalam pelaksanaan transfer embrio (TE). Manfaat lain dari teknologi IVF adalah membuka peluang yang lebih besar untuk mengembangkan teknik manipulasi gamet dan embrio seperti produksi kloning (Gordon, 1994).

Fertilisasi oosit terjadi di tahap metafase II. Preparasi spermatozoa meliputi pencucian spermatozoa dari pengencer dan kapasitasasi spermatozoa. Kapasitasasi spermatozoa secara in vitro dilakukan untuk meningkatkan motilitas dan kemampuan spermatozoa dalam pelepasan tudung akrosom dan asam hyaluronidase, fungsi asam hyaluronidase untuk memudahkan spermatozoa menembus zona pelusida dan membran vitelin oosit (Boediono *et al.*, 2000).

Proses fertilisasi meliputi penetrasi spermatozoa pada zona pelusida, terkelupasnya dan hilangnya membran akrosom bagian luar yang bervesikula dan membran plasma pada permukaan zona. Penerobosan melalui zona sebagian disebabkan oleh aksi setempat dari akrosin yang berkaitan dengan membran, tetapi peningkatan motilitas akibat kapasitasasi tetap berperan penting dalam fase penetrasi. Langkah ini diikuti perlekatan spermatozoa pada membran plasma

(vitelina) sel telur, berhentinya aktivitas flagela, penggabungan kepala spermatozoa ke dalam ooplasma melalui peleburan membran plasma, dekondensasi kromatin, dan pembentukan pronukleus jantan (Adifa *et al.*, 2010).

Kriopreservasi dan Krioprotektan

Teknik kriopreservasi pada berbagai sel, jaringan, dan organ telah banyak dilakukan, demikian juga dengan kriopreservasi embrio. Salah satu cara penyediaan embrio yang telah banyak dilakukan adalah pengawetan dengan metode pembekuan dan metode vitrifikasi. Pembekuan embrio ini kemudian diikuti dengan berbagai penelitian mengenai kriopreservasi oosit sebagai alternatif penyediaan gamet. (Rimayanti, 2005).

Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa atau oosit ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum deep freezing maupun dehidrasi pada saat pencairan kembali (*thawing*) menjadi perhatian khusus.

Krioprotektan adalah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan (Blanco *et al.*, 2000). Penggunaan krioprotektan bertujuan melindungi oosit dari penurunan kualitas dan memberi media bagi oosit seperti keadaan lingkungan asli (Wahjuningsih, 2013).

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) yang memiliki rumus kimia $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ merupakan senyawa yang mempunyai bobot molekul rendah senyawa yaitu 78,13 g/mol sehingga lebih cepat masuk ke dalam sel pada proses kriopreservasi. Senyawa DMSO memiliki tingkat titik beku yang tinggi sehingga dapat mencegah pembentukan kristal es. Cairan tidak berwarna ini merupakan pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan baik senyawa polar dan nonpolar dan larut dalam berbagai pelarut organik maupun air (Gazali dan Tambing, 2001). Penelitian yang diperoleh Hartady *et al* (2018) bahwa konsentrasi krioprotektan *Dimethyl Sulfoxide* 17% + etilen glikol 17% yang tinggi dalam larutan vitrifikasi mengurangi kemungkinan kristalisasi intraseluler yang dianggap menyebabkan kerusakan selama proses pembekuan cepat, tetapi juga dapat menyebabkan efek toksisitas dan stres osmotik pada oosit walaupun tanpa pendingin, persentase oosit yang hidup sebesar 75%.

Etilen glikol efektif digunakan sebagai krioprotektan untuk kriopreservasi embrio dan diaplikasikan pula pada kriopreservasi oosit. Berat molekul etilen glikol yang rendah (62,07) memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi (Gordon, 1994). Kelebihan etilen glikol sebagai krioprotektan adalah karena toksisitasnya yang rendah dan dapat mempertahankan daya hidup oosit. Memiliki sifat cairan jernih, tidak berbau, tidak berwarna, berasa manis dan larut sempurna dalam air (Kusumadewi, 2012). Peningkatan konsentrasi etilen glikol pada suhu yang ekstrim dapat menghindarkan terjadinya kristal es intraseluler, sehingga mengurangi kerusakan yang terjadi akibat proses vitrifikasi (Mohammad dkk, 2005). Menurut Wahjuningsih (2013) Penggunaan etilen glikol pada konsentrasi 10% dan 20%, oosit mengalami kerusakan. Pada

konsentrasi rendah krioprotektan tidak mampu melindungi oosit selama proses vitrifikasi sehingga mengalami kerusakan saat terkena paparan suhu dingin dan penggunaan konsentrasi yang tinggi oosit banyak mengalami kematian terkhususnya pada konsentrasi 50%, konsentrasi 30% dengan paparan 3 menit menghasilkan keberhasilan menjaga oosit sebesar 82,86%. Penelitian Rimayanti (2005) menunjukkan bahwa penggunaan etilen glikol pada konsentrasi 40% dengan lama waktu paparan 10, 20 dan 30 menit dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca *thawing*.

Hipotesis

Penggunaan kombinasi etilen glikol dengan *Dimethyl Sulfoxide* sebagai media krioprotektan dapat mempertahankan tingkat fertilisasi oosit sapi Bali saat kriopreservasi.