

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produksi embrio secara *in vitro* telah menjadi salah satu teknologi reproduksi dalam upaya percepatan peningkatan produksi ternak. Sumber oosit yang digunakan umumnya memanfaatkan ovarium dari hasil rumah potong hewan (RPH). Namun dalam produksi embrio secara *in vitro* lebih rendah dibandingkan secara *in vivo* (Wang dkk., 2013). Hal tersebut kemungkinan disebabkan akibat paparan oksigen terhadap oosit menjadi salah satu faktor rendahnya produksi embrio secara *in vitro*. Pada media *in vitro* umumnya dilakukan pada lingkungan dengan kadar oksigen hampir sama dengan kadar atmosfer yaitu 20%, sedangkan pada saat *in vivo* di uterus dan oviduk hanya terpapar dengan oksigen berkisar 5% (Hashimoto dkk., 2000). Akibat tingginya kadar oksigen pada kondisi *in vitro* dapat memicu terjadinya peningkatan produksi radikal bebas berupa turunan oksigen yang dikenal dengan *reactive oxygen species* (ROS) (Agarwal dkk., 2005).

Produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang rendah berfungsi untuk mengatur tingkat seluler *redox homeostasis* dan sebagai fungsi normal fisiologis (Gupta dkk., 2009). Namun pada produksi yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada struktur sel antara lain disfungsi mitokondria, mikrotubulus, DNA, RNA, dan gangguan fungsi normal sel (Takahashi dkk., 2000). Hasil dari produksi ROS dapat berupa *superoxide anion*, *hydrogen peroxide*, dan *lipid peroxide* (Wang dkk., 2007). Metabolisme sel yang tinggi menghasilkan ROS seperti *hydrogen peroksida* (H_2O_2) yang dapat bereaksi dengan kation logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) menjadi radikal bebas berupa *anion hidroksil* (OH^-). Radikal bebas (OH^-) tersebut berbahaya karena merusak membran, sehingga akan mengganggu disfungsi fisiologis sel (Gupta dkk., 2009; Nugroho dkk., 2017). Kelebihan radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan apabila berikatan dengan elektron dari asam nukleat, lemak, protein, karbohidrat dan molekul-molekul lainnya. Ikatan tersebut dan stabilisasinya dapat menyebabkan kerusakan seluler yang mempengaruhi perkembangan oosit, sperma, dan embrio dalam lingkungan mikro (Agarwal dkk., 2006).

Secara *in vivo*, kerusakan sel akibat paparan radikal bebas dapat dicegah dengan *endogenous* antioksidan yang dimiliki oleh sel, yaitu enzim *superoxide dismutase* (SOD), *katalase* (CAT), dan *glutathione* (GSH) (Gupta dkk., 2009). Namun pada proses *in vitro*, level dari *endogenous* antioksidan lebih rendah dibandingkan pada *in vivo*. Oleh karena itu dibutuhkan penambahan bahan antioksidan dalam proses maturasi dan fertilisasi oosit secara *in vitro* untuk menghambat kerusakan sel akibat ROS dan dengan adanya penambahan antioksidan dapat meningkatkan laju pertumbuhan sel pada oosit.

Penambahan katalase dilaporkan mampu menurunkan level ROS pada embrio dan meningkatkan potensi perkembangan embrio (Wang dkk., 2013). Katalase adalah enzim antioksidatif yang mendetoksifikasi ROS dengan mengubah

H₂O₂ yang berpotensi toksik menjadi air dan oksigen (Halliwell dkk., 2007). Selain katalase, penggunaan antioksidan dalam produksi embrio secara *in vitro* adalah hipotaurin.

Hipotaurin (C₂H₇NO₂S) adalah salah satu antioksidan yang banyak ditemukan pada tuba falopi dan cairan folikel yang berfungsi mempertahankan embrio dari *oksidatif stress* (OS) (Guerin dkk., 2001). Penambahan hipotaurin pada media maturasi dapat mencegah pembentukan *radikal hidroksil* (OH⁻) sehingga dapat meningkatkan ekspansi sel kumulus dan tingkat kematangan inti (Novitasari dkk., 2022). Pada media kultur hipotaurin berperan dalam mengurangi kandungan H₂O₂ dan kerusakan DNA sehingga meningkatkan perkembangan embrio babi ke tahap blastosis (Suzuki dkk., 2006). Oleh karena, maka akan dilakukan penelitian mengenai penggunaan katalase dan hipotaurin sebagai antioksidan pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro*, untuk meningkatkan kematangan inti, fertilisasi serta menurunkan konsentrasi H₂O₂ pada oosit sapi bali secara *in vitro*.

1.2 Landasan Teori

Produksi embrio secara *in vitro* merupakan teknologi dalam bidang reproduksi. Teknologi ini dapat memanfaatkan limbah ovarium yang terbuang dari rumah potong hewan (RPH). Produksi embrio secara *in vitro* melalui beberapa tahap yaitu maturasi *in vitro*, fertilisasi *in vitro* dan kultur *in vitro* (Luciano dkk., 2018). Maturasi oosit didefinisikan sebagai permulaan dan penyelesaian pembelahan meiosis pertama hingga pada tahap *metaphase-II* (MII), yang diikuti oleh maturasi sitoplasma dan maturasi inti. Meiosis I pada tahap GV ditandai dengan adanya membran nukleus yang tampak jelas, dimana inisiasi meiosis dipengaruhi oleh adanya lonjakan *luteinizing hormone* (LH) (Elder dan Dale., 2011). Maturasi inti diawali dengan terjadinya GVBD, yaitu pecahnya membran nukleus yang secara tidak langsung dikontrol oleh sel granulosa melalui sistem *gap junction* yang menyatukan oosit dengan sel kumulus (Chian dkk., 1992). Maturasi inti pada *metaphase-I* (MI) yaitu kromosom homolog mulai tersusun berderet di bidang ekuator (Campbell dkk., 2002; Riyuska., 2018). Selanjutnya, oosit masuk ke meiosis II yaitu MII yang ditandai dengan adanya polar body I (Gordon., 2003). Maturasi sitoplasma merupakan persiapan sitoplasma oosit untuk dapat difertilisasi dan berkembang ke tahap embrio (Chian dkk., 1992)

Fertilisasi secara *in vitro* merupakan teknik yang dilakukan untuk penggabungan gamet jantan dan betina (Gordon., 2003). Keberhasilan fertilisasi secara *in vitro* yaitu spermatozoa terlebih dahulu harus mengalami proses kapasitasi. Kapasitasi adalah persiapan dan perubahan fisiologis spermatozoa agar mampu melakukan fertilisasi. Pada saat kapasitasi terjadi perubahan-perubahan akrosom yang disebut dengan reaksi akrosom, reaksi ini menyebabkan spermatozoa mampu berikatan dengan reseptor oosit. Ikatan reseptor ini dapat menyebabkan aktivasi protein G, aktifnya protein G menyebabkan aktivasi *phospholipase C* (PLC) yang mengkatalisis *hidrolisis phosphatidylinositol 5,4 bisphosphate* (PIP₂) di membran plasma yang kemudian menghasilkan *inositol 1,4,5 triphosphate* (IP₃) dan

diacylglycerol (DAG). Selanjutnya IP_3 berikatan dengan reseptor (IP_3R) yang terdapat di permukaan retikulum endoplasma. Ikatan ini kemudian menyebabkan fluktuasi kalsium (Ca^{2+}) pada permukaan retikulum endoplasma. Keluarnya Ca^{2+} intraseluler ke sitoplasma menyebabkan peningkatan enzim protease yang menginaktivasi aktivitas *maturation promoting factor* (MPF) (Gilbert., 2000; Abrieu dkk., 2001). Inaktivasi MPF saat fertilisasi menyebabkan pembentukan pronukleus (Kikuchi dkk., 2000).

Reactive oxygen species (ROS) merupakan produk normal dari aktivitas metabolisme. ROS seperti *superoxide*, radikal bebas seperti *anion hidroksil*, dan *reactive nitrogen species* seperti *nitric oxide* (NO) dan *peroxynitrite* terbentuk ketika sel dalam keadaan stres oksidatif atau saat inflamasi untuk melawan patogen. Radikal bebas dapat merusak *deoxyribonucleic acid* (DNA), protein, dan lemak secara langsung pada sel (Lamirande dkk., 1997). Mitokondria merupakan penghasil *reactive oxygen species* (ROS) terbesar di dalam sel. Asal mula terjadinya ROS dimulai dari transfer elektron (e^-) kepada molekul oksigen (O_2) menjadi radikal *superoxide* (O_2^-) (Muller dkk., 2004). Akumulasi O_2^- yang berlebihan dikeluarkan dari matrik mitokondria melalui *inner membrane anion channel* (IMAC) ke ruang *intermembrane*. Sebagian dikeluarkan dari mitokondria melalui *voltage-dependent anion channels* (VDAC) (Sena dan Chandel., 2012) dan sisanya direduksi oleh enzim *superoxide dismutase* (SOD) menjadi *hydrogen peroksida* (H_2O_2). *Hydrogen peroksida* dapat bereaksi dengan adanya transisi reduksi unsur logam (Fe^{2+} atau Cu^+) yang menyebabkan perubahan bentuk H_2O_2 menjadi radikal bebas berupa *anion hidroksil* (OH^-) melalui reaksi fenton. Ion OH^- merupakan radikal yang paling reaktif dengan *half-life* 10^{-9} S (Pastor dkk., 2000). Ion OH^- dapat berkonjugasi dengan asam lemak membentuk *lipid peroksida* (L-OOH) yang mampu merusak membran dan DNA sehingga dapat mengganggu fungsi fisiologis (Gupta dkk., 2009).

Katalase adalah enzim antioksidan yang ditemukan dalam sel yang aktif secara *aerobik*, yang mendetoksifikasi ROS dengan mengubah H_2O_2 menjadi molekul air dan oksigen (Gupta dkk., 2011). Katalase secara signifikan mengurangi stres oksidatif dan memulihkan struktur mitokondria dengan meningkatkan potensial membran mitokondria sehingga memainkan efek anti apoptosis dan menormalkan kapasitas replikasi dan penyembuhan luka (Li dkk., 2018; Zamponi dkk., 2018; Su dkk., 2019).

Hipotaurin ($C_2H_7NO_2S$) adalah salah satu antioksidan yang banyak ditemukan pada tuba falopi dan cairan folikel yang berfungsi mempertahankan embrio dari *oksidatif stress* (OS) (Guerin dkk., 2001). Hipotaurin dapat melindungi kehidupan spermatozoa, proses kapasitasi dan fertilisasi dari kerusakan akibat peroksidasi (Guerin dkk., 1995). Mencegah peroksidasi lemak membran (Tadolini dkk., 1995). Hipotaurin dapat bereaksi dengan *hydrogen peroksida* (H_2O_2) membentuk taurin (Grove dan Karpowicz., 2017), yang berperan sebagai antioksidan yang menghilangkan *radikal hidroksil* (OH^-) (Chen dkk., 2020). Hipotaurin juga berfungsi sebagai asam amino yang berperan penting dalam melindungi DNA dan mengurangi fermentasi DNA yang dipicu oleh stress oksidatif (Partyka dkk., 2017).

1.3 Rumusan Masalah

Pemanfaatan ovarium sapi bali dari rumah potong hewan (RPH) masih sangat terbatas. Produksi embrio secara *in vitro* masih sangat rendah, diakibatkan karena rendahnya kualitas oosit hasil IVM dan IVF yang disebabkan oleh kerusakan sel akibat stress oksidatif yang dihasilkan karena meningkatnya produksi radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS). Pada media maturasi katalase berperan pada penguraian H_2O_2 menjadi molekul air dan oksigen. Hipotaurin pada media maturasi berperan mencegah pembentukan *radikal Hidroksil* (OH^\cdot). Pengkajian perkembangan oosit ke tahap *metafase II* berhubungan dengan *hydrogen proksida* (H_2O_2). Secara *in vivo*, aktivitas katalase tinggi pada ampula, yang merupakan tempat fertilisasi begitupun hipotaurin banyak ditemukan pada tuba falopi yang dimana tempat terjadinya fertilisasi. Kombinasi katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi berperan menguraikan *hidrogen peroksida* (H_2O_2) menjadi $H_2O + O_2$, mencegah pembentukan *radikal hidroksil* (OH^\cdot). Berdasarkan latar belakang penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi secara *in vitro* untuk melihat tingkat pematangan inti dan fertilisasi oosit sehingga rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu;

- Bagaimana tingkat pematangan inti oosit dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi *in vitro*?
- Bagaimana konsentrasi H_2O_2 oosit dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi *in vitro*?
- Bagaimana tingkat fertilisasi oosit dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro*?
- Bagaimana tingkat fertilisasi oosit dengan penambahan kombinasi katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro*?
- Bagaimana pengaruh H_2O_2 terhadap tingkat pematangan inti dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi *in vitro*?
- Bagaimana pengaruh H_2O_2 terhadap tingkat fertilisasi dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro*?

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Mengetahui efektivitas penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi terhadap tingkat pematangan inti oosit.
- Mengetahui tingkat konsentrasi H_2O_2 dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi *in vitro*.
- Mengetahui efektivitas penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro* terhadap tingkat fertilisasi oosit.
- Mengetahui efektivitas penambahan kombinasi katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro* terhadap tingkat fertilisasi oosit.

- Mengetahui hubungan H_2O_2 dengan tingkat pematangan inti pada penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi.
- Mengetahui hubungan H_2O_2 dengan tingkat fertilisasi pada penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi kepada pembaca mengenai efektivitas katalase dan hipotaurin terhadap pematangan inti, fertilisasi, konsentrasi hidrogen peroksida dan korelasi hidrogen peroksida dengan tingkat pematangan inti dan fertilisasi yang diproduksi secara *in vitro*.

1.6 Hipotesis

Media maturasi dan fertilisasi yang ditambahkan katalase, hipotaurin dan kombinasi (katalase dan hipotaurin) dapat meningkatkan pematangan inti, fertilisasi dan mengurangi konsentrasi hidrogen peroksida oosit yang diproduksi secara *in vitro*.

BAB II

MATERI DAN METODE

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari - Juli 2024, bertempat di gedung LPPM unhas (Laboratorium Produksi Embrio *In Vitro*).

2.2 Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan spermatozoa dari (UPT Pelayanan Inseminasi Buatan (IB) dan Produksi Semen) Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan dan ovarium diperoleh dari RPH Makassar. Bahan-bahan yang digunakan antara lain medium transportasi ovarium, medium *in vitro fertilization*, medium *in vitro maturasi*, *aceto orcein* 2%, asam asetat 25%, etanol absolute, alkohol 70%, tissue, mineral oil, aluminium foil, *vaseline*, katalase dan hipotaurin.

Alat yang digunakan adalah inkubator CO₂, pipet pasteur, tabung reaksi, mikroskop, alat sterilisasi (oven dan autoklaf), scalpel, bunsen, botol, laminar air flow, petri dish (Nunc, diameter 3,5 cm), gelas kimia, labu erlenmeyer, freezer, timbangan analitik, kaca objek, kaca penutup, mikropipet, cawan petri dan gunting bedah.

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 12 perlakuan dan masing-masing 4 ulangan. Penelitian tahap (I) berupa maturasi oosit secara *in vitro* dengan penambahan katalase dengan dosis 0 UI/ml, 50 UI/ml, 100 UI/ml, 150 UI/ml. Penelitian tahap (II) berupa maturasi oosit secara *in vitro* dengan penambahan hipotaurin dengan dosis 0 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM. Penelitian tahap (III) adalah maturasi dan fertilisasi oosit secara *in vitro* dengan dosis 0, terbaik tahap (I), terbaik tahap (II) dan kombinasi terbaik dari tahap I dan II.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Tahap Pertama, Maturasi Oosit dengan Penambahan Katalase

Koleksi dan pematangan oosit secara *in vitro*

Ovarium sapi diambil dari rumah potong hewan (RPH) Kota Makassar, kemudian dibawa ke laboratorium menggunakan botol berisi larutan NaCl 0,9% yang ditambahkan antibiotik 0,1 mg/mL *streptomycin* dan 100 mg/mL *penicillin* (Hasbi dkk., 2020), di laboratorium ovarium kemudian dicuci kembali dengan NaCl 0,9%.

Koleksi oosit dilakukan dengan metode *slicing* (pencacahan) dari ovarium (Wang dkk., 2007). Pencacahan dilakukan di cawan petri yang berisi *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah dengan 0,2% *bovine serum albumin* (BSA), 100 IU/mL *penicillin* dan 0,1 mg/mL *streptomycin* (Hasbi dkk., 2020). Oosit yang terlepas dari ovarium langsung diamati di bawah mikroskop, dan oosit yang digunakan dikelilingi sel-sel kumulus kompak dan mempunyai sitoplasma yang homogen (Setiadi dkk., 2007). Oosit yang diperoleh selanjutnya dipindahkan kedalam cawan

petri yang telah berisi media maturasi untuk pencucian oosit sebanyak 3 kali dan kemudian dimatangkan pada media maturasi M-199 yang ditambahkan 0,3% (BSA), 10 IU/mL follicle-stimulating hormone (FSH), 10 IU/mL *human chorionic gonadotropin* (HCG), dan 50 µg/mL *gentamicin* (Hasbi dkk., 2020). Sebagai perlakuan, penambahan katalase dengan dosis (0 UI/ml, 50 UI/ml, 100 UI/ml, 150 UI/ml). Pematangan oosit dilakukan pada cawan petri dalam bentuk drop masing-masing 80 µL (10-15 oosit) yang ditutupi dengan mineral oil. Oosit diinkubasikan dalam inkubator CO₂ dengan temperatur 38,5° C dengan tekanan CO₂ 5% selama 24 jam (Hasbi dkk., 2020).

Parameter yang diamati.

1. Evaluasi konsentrasi H₂O₂

Oosit yang telah dimaturasi diinkubasi selama 15 menit dalam media maturasi yang mengandung 10 µM DCHFDA, kemudian dicuci dalam media segar sebelum ditempatkan pada kaca gelas objek dan ditutup dengan cover glass. Emisi fluoresensi direkam dengan kamera digital (Zeiss AxioCam HRc, Jerman) yang terpasang pada mikroskop fluoresensi (Zeiss Axio Image A2) setelah eksitasi pada emisi 480 nm dan 510 nm. Gambar neon dikonversi ke file TIFF menggunakan Adobe Photoshop CS3 (Adobe systems inc., San Jose, CA), kemudian dianalisis dengan perangkat lunak imageJ 1.47 (Sun Microsystems, inc., California, USA). Gambar fluoresensi diukur dengan menghitung jumlah piksel setelah inversi warna. Intensitas fluoresensi mewakili konsentrasi H₂O₂ intraseluler (Gustiana dkk., 2019).

2. Evaluasi tingkat maturasi oosit

Oosit yang telah dimaturasi didenudasi sel-sel kumulusnya dengan bantuan *enzim hyaluronidase* 0,25% dengan dipipet berulang kali menggunakan pipet yang sesuai dengan ukuran oosit. Kemudian oosit dibilas dengan PBS+BSA 0,3%. Oosit yang telah dilepaskan sel kumulusnya diletakkan pada drop PBS+BSA 0,3% di atas gelas objek yang telah diberi bantalan *vaseline* pada keempat sisi, kemudian difiksasi dan ditutup dengan *cover glass* sambil meratakan *vaseline* agar menempel sempurna pada gelas objek. Preparat selanjutnya difiksasi dalam larutan asam asetat dan *etanol absolute* dengan perbandingan 1:3 selama 3 hari. Setelah 3 hari preparat diwarnai dengan 2% *aceto-orcein*, kemudian pewarnaan dibilas dengan 25% asam asetat, selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop (Zeiss Axio Image A2) dengan kamera Zeiss Axio cam HRc (Hasbi dkk., 2020). Evaluasi tingkat kematangan inti diamati dengan menghitung jumlah oosit pada setiap tahap meiosis mulai dari *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metafase I* (MI) dan *metafase II* (MII) (Shirazi dan Sadiqhi., 2007; Hasbi dkk, 2020). Tingkat maturasi merupakan perbandingan antara jumlah oosit yang mencapai MII dengan jumlah keseluruhan oosit yang dimaturasi.

$$\text{Tingkat maturasi} = \frac{\text{Jumlah oosit yang mencapai metafase II}}{\text{jumlah oosit yang dimaturasi}} \times 100\%$$

2.3.2 Tahap kedua, Maturasi Oosit dengan Penambahan Hipotaurin

Pada tahap II, perlakuan penelitian dilakukan dengan penambahan hipotaurin pada media maturasi dengan dosis (0 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM). Proses koleksi dan maturasi dilakukan sesuai dengan metode pada tahap I, begitupun dengan evaluasi konsentrasi H₂O₂ dan evaluasi tingkat maturasi.

2.3.3 Tahap Ketiga, Fertilisasi oosit dengan Penambahan Katalase dan Hipotaurin

Pada tahap III, penelitian dilakukan dengan penambahan katalase dan hipotaurin pada media maturasi dan fertilisasi *in vitro*. Sebagai perlakuan dengan dosis (0, terbaik tahap I, terbaik tahap II, kombinasi terbaik tahap I dan II). Koleksi dan maturasi oosit dilakukan sesuai dengan metode pada tahap I.

Fertilisasi oosit dilakukan menggunakan semen beku dari UPT Pelayanan Inseminasi Buatan (IB) dan Produksi Semen Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan. Semen beku sapi bali di *thawing* dengan suhu 37°C selama 20 detik. Dilakukan pengamatan motilitas semen di bawah mikroskop selanjutnya semen dimasukkan ke dalam media fertilisasi kemudian di sentrifugasi pada kecepatan 1.800 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali, selanjutnya bagian dari supernatan dibuang dan endapan spermatozoa diencerkan lagi dengan media fertilisasi hingga mendapatkan konsentrasi 1,5 x 10⁶ spermatozoa/mL (Hasbi dkk., 2020). Campuran spermatozoa dan media fertilisasi di masukkan ke dalam cawan petri dalam bentuk drop 80 µL dan ditutupi dengan mineral oil. Media fertilisasi yang digunakan dibuat dalam bentuk stok 100 ml, dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pembuatan media fertilisasi dalam bentuk stok 100 ml

| No | Bahan | Mg/ 100 ml |
|----|---|------------|
| 1 | NaCl (Natrium/ Sodium Chloride) | 525,96 |
| 2 | KCL (Kalium Chloride) | 89,46 |
| 3 | NaHCO ₃ (Natrium Bicarbonate) | 210,03 |
| 4 | NaH ₂ PO ₄ (Natrium Dihydrogen Phosphate Monohydrate) | 6,00 |
| 5 | MgSO ₄ 2H ₂ O (Magnesium Sulfate- Heptahydrate) | 12,33 |
| 6 | sodium lactate 60% syrup | 112,10 |
| 7 | Hepas | 238,30 |
| 8 | CaCl ₂ 2H ₂ O (Calsium Chloride_Dihydrate) | 117,60 |
| 9 | Sodium pyruvate | 22,00 |
| 10 | Caffeine anhydrous | 38,84 |
| 11 | BSA (Bovine serum albumin) fraksi V | 500 |

Sumber: (Suzuki dkk, 2000)

Oosit yang sudah dimaturasi dicuci dalam media fertilisasi sebanyak 2 kali, selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah terisi campuran spermatozoa dan media fertilisasi lalu ditutupi dengan mineral oil, kemudian diinkubasi selama 24 jam kedalam inkubator CO₂ 5% temperatur 38,5°C (Hasbi dkk., 2020).

Parameter yang diamati.

1. Evaluasi konsentrasi H₂O₂

Oosit yang telah difertilisasi diinkubasi selama 15 menit dalam media fertilisasi yang mengandung 10 µM DCHFDA, kemudian dicuci dalam media segar sebelum ditempatkan pada kaca gelas objek dan ditutup dengan cover glass. Emisi fluoresensi direkam dengan kamera digital (Zeiss AxioCam HRc, Jerman) yang terpasang pada mikroskop fluoresensi (Zeiss Axio Image A2) setelah eksitasi pada emisi 480 nm dan 510 nm. Gambar neon dikonversi ke file TIFF menggunakan Adobe Photoshop CS3 (Adobe systems inc., San Jose, CA), kemudian dianalisis dengan perangkat lunak imageJ 1.47 (Sun Microsystems, inc., California, USA). Gambar fluoresensi diukur dengan menghitung jumlah piksel setelah inversi warna. Intensitas fluoresensi mewakili konsentrasi H₂O₂ intraseluler (Gustiana dkk., 2019).

2. Evaluasi tingkat fertilisasi oosit

Oosit yang telah difertilisasi didenusasi sel-sel kumulusnya dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0,25% dengan dipipet berulang kali menggunakan pipet yang sesuai dengan ukuran oosit. Kemudian oosit dibilas dengan PBS+BSA 0,3%. Oosit yang telah dilepaskan sel kumulusnya diletakkan pada drop PBS+BSA 0,3% di atas gelas objek yang telah diberi bantalan *vaseline* pada keempat sisi, kemudian difiksasi dan ditutup dengan *cover glass* sambil meratakan *vaseline* agar menempel sempurna pada gelas objek. Preparat selanjutnya difiksasi dalam larutan asam asetat dan *etanol absolute* dengan perbandingan 1:3 selama 3 hari. Setelah 3 hari preparat diwarnai dengan 2% *aceto-orcein*, kemudian pewarna dibersihkan dengan 25% asam asetat, selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop (Zeiss Axio Image A2) dengan kamera Zeiss Axio cam HRc (Hasbi dkk., 2020).

Penentuan tingkat kemampuan fertilisasi in vitro dilakukan berdasarkan pembentukan dan jumlah pronucleus (PN). Oosit yang terfertilisasi normal ditandai dengan terbentuknya dua pronucleus 2 PN dalam sitoplasma oosit, sedangkan yang terfertilisasi polispermi terdiri dari lebih 2 PN (Yasmin, 2014).

$$\text{Tingkat fertilisasi} = \frac{\text{Jumlah oosit yang mengalami tahap tingkat fertilisasi}}{\text{Jumlah oosit yang difertilisasi}} \times 100\%$$

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian tahap pertama, kedua, dan ketiga dianalisis menggunakan uji ANOVA pada aplikasi SPSS versi 22.0. Apabila terdapat perbedaan perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncun's Multiple Range Test (DMRT) (Stell dan Torrie 1993). Model matematika rancangan yang digunakan, sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + N_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Hasil pengamatan dari perlakuan ke-I dan kelompok ke-j

μ = Nilai rata-rata hasil pengamatan

N_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Pengaruh acak perlakuan ke-i dalam pengulangan ke-j