

DISERTASI

**KAJIAN *IN VITRO* EMBRIO SAPI BALI UNTUK
MENGHASILKAN KUALITAS EMBRIO YANG LAYAK
TRANSFER**

*STUDY OF BALI CATTLE EMBRYOS TO PRODUCE EMBRYOS
SUITABLE FOR TRANSFER IN VITRO*

ERNI DAMAYANTI



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**KAJIAN *IN VITRO* EMBRIO SAPI BALI UNTUK
MENGHASILKAN KUALITAS EMBRIO YANG LAYAK
TRANFER**

*STUDY OF BALI CATTLE EMBRYOS TO PRODUCE EMBRYOS
SUITABLE FOR TRANSFER IN VITRO*

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar doktor

Program Studi
Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

ERNI DAMAYANTI

Kepada

**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**


DISERTASI
KAJIAN *IN VITRO* EMBRIO SAPI BALI UNTUK MENGHASILKAN EMBRIO
YANG LAYAK TRANSFER

Disusun dan diajukan oleh

ERNI DAMAYANTI
NIM P013191034

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Doktor Program Studi Ilmu Pertanian
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 22 Desember 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui
Promotor


Prof. Dr. Ir. Hery Sorlaya, DES., DEA.
Nip 19570129 198003 1 001


Ko-promotor

Ko-promotor


Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc.
Nip 19641231 198903 1 025

Pt. Ketua Program Studi
Doktor Ilmu Pertanian


Prof. Dr. Baharuddin, S.T., M.Arch., Ph.D.
Nip 19690308 199512 1 001


Dr. Hesti, S.Pt., M.Si.
Nip 1977100 20050 1 001

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin


Prof. Dr. Hesti, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed.
Nip 1977100 20050 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul "Kajian *In Vitro* Embrio Sapi Bali untuk Menghasilkan Kualitas Embrio yang Layak Transfer" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES., DEA., Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco., M.Sc, dan Dr. Hasbi., S.Pt, M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 22 Desember 2022



Emi Damayanti
P013191034

UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillahirrahmanirahim, dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan puji dan syukur atas hadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan disertasi ini dengan judul “Kajian *In Vitro* Embrio Sapi Bali untuk Menghasilkan Kualitas Embrio yang Layak Transfer”. Untuk itu penulis ucapkan rasa syukur kehadirat-Nya seraya mengucapkan segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam, dengan terselesaikannya disertasi ini yang merupakan salah satu persyaratan akademik guna memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Pertanian Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyelesaian disertasi ini telah melibatkan berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, perorangan maupun lembaga yang telah memberikan kontribusi dalam penyelesaian penyusunan disertasi ini. Kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya., DEA DES., selaku Promotor, Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc. dan Dr. Hasbi., S.Pt, M.Si selaku Ko-promotor, dengan kepakaran yang melekat telah meluangkan waktu dan memberikan kontribusi bagi terwujudnya disertasi ini. Para promotor dan ko-promotor dan dengan kesabaran, perhatian dan keikhlasannya telah memberikan dorongan, koreksi dan saran baik dari aspek metodologi penelitian maupun penyajian isi disertasi secara keseluruhan. Penulis menjadi terbuka cakrawala/pandangan, mendorong munculnya gagasan, ide-ide pembaharuan khususnya dalam bidang pendidikan. Untuk itu sekali lagi penulis menghaturkan penghormatan dan penghargaan yang setinggi-tingginya serta mengucapkan terima kasih dengan iringan doa “semoga amal baik beliau diterima dan mendapat balasan dari Allah Yang Maha Kasih, Maha Sayang dan Maha Pemurah”.

2. Penulisan disertasi ini juga tidak lepas dari kontribusi Prof. Dr. drh. Ratmawati Malaka M.Sc., Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc. IPU., ASEAN Eng., Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Tolleng, M.Sc dan Prof. Dr. Ir. Ismartoyo, M.Sc yang telah meluangkan waktunya memberikan saran dan masukan yang sangat mendukung dalam perbaikan pelaksanaan penelitian dan penulisan disertasi ini maka dari itu penulis sangat berterimakasih atas hal tersebut.

3. Prof. Dr. Dwia aries Tina Pulubuhu, M.A. selaku Rektor Unhas priode 2018-20222 dan Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M. Sc selaku dekan Sekolah Pascasarjana Unhas periode 2018-2022 beserta jajarannya.
4. Rektor Unhas Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M. Sc, Dekan Prof. dr. Budu, Ph.D.,Sp.M(K),M. MedEd. Wakil Dekan dan seluruh Bapak Ibu Dosen yang telah melimpahkan ilmunya kepada penulis, dan Bapak Ibu Staf Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang membantu dalam pengurusan administrasi.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Darmawan Salman, M.S., selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Pertanian Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
6. Penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pelaksana beasiswa program magister menuju doktor sarjana unggul (PMDSU) yang telah memberikan beasiswa kepada penulis selama 4 tahun dan beasiswa PKPI selama 4 bulan di BRIN sehingga penulis dapat menyelesaikan studi doktoral dibidang ilmu pertanian khususnya peternakan.
7. Ibu Dr. Ekayanti Muliawati Kaiin M.Si, atas kesediaanya sebagai penguji luar komisi pada ujian akhir disertasi dan sebagai pembimbing selama penulis melakukan kegiatan Peningkatan Kualitas publikasi internasional (PKPI) di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang sangat baik hati dalam membimbing memberikan saran dan masukan serta meluangkan waktunya.
8. Ayahanda Abd. Rasyid dan ibunda Syamsidar atas segala kasih sayang dan perhatian serta doa-doa dari beliau, kepada adik-adik tercinta yang selalu memberikan dukungan dan menjadi semangat bagi penulis serta seluruh keluarga yang tak hentinya memberikan dukungan kepada penulis.
9. Semua teman-teman angkatan Program Magister menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU) Batch 4 yang telah berjuang bersama-sama dalam program pendidikan doktor dibidang masing-masing khususnya kepada kakak Dr. Hikmayani Iskandar S.Pt yang telah banyak berdiskusi bersama dengan penulis.
10. Ibu Dr. Sri Gustina S.Pt M.Si yang bersedia berbagi ilmu pada penulis khususnya dalam produksi embrio secara *in vitro* dan kepada kak Masturi S.Pt, M.Si, kak Hasrin S.Pt, M.Si, kak Adly S.Pt, M.Si, dan Nurul Ahmad S.Pt yang telah membantu diawal penelitian.
11. Teman terdekat "The Kardashian Fams" Eka Hardiyani S.Pt, M.Agb, Sri Wira Utami S.Pt, M.Si, Annisa Mutiah, S.Pt, Herly M S.Pt, Yuliati R S.Pt, Sri Uthami Bakri S.Pt, Nur Fajriah Alwi S.Pt dan Sitti Rahmini S.Pt, yang telah banyak membantu penulis. Teman terdekat lainnya Nirwana S.Pt, Dian Justisia Ningrum

S.Pt, Marwah S.Pt, M.Si dan Evy Hasrianti Anggraeni S.Pt, Ulfa Triana Ilyas S.Pt.

12. Teman-teman di laboratorium produksi embrio *in vitro* Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Hasanuddin terkhusus kepada adik Fara Fathiani yang selalu meluangkan waktu dan membantu penulis, juga kepada adik Hilya Miftahul Uswa S.Pt, M.Si, Wildayanti S.Pt, Mutmainnah S.Pt, M.Si, Kirana Dara Dinanti S.Pt, M.Si dan Andi Tifal S.Pt.

13. Kepada deng Nompo dan semua staff di Rumah Potong Hewan (RPH) Antang Makassar yang telah banyak membantu dalam pengambilan sampel selama penelitian.

14. Teman-Teman S2 Sistem-Sistem Pertanian angkatan 2018 dan S3 Ilmu Pertanian angkatan 2019 yang saling berbagi semangat dan dukungan.

Demikian pula kepada seluruh pihak yang telah mendukung dan membantu sehingga penulisan disertasi ini berjalan dengan baik. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah kalian berikan kepada penulis. Akhir kata penulis tetap mengharapkan masukan dalam rangka perbaikan semoga disertasi ini dapat bermanfaat dan dapat menjadi khasanah keilmuan Aamiin Ya Rabbalalamiin.

Makassar, Desember 2022



Erni Damayanti

ABSTRAK

ERNI DAMAYANTI. Kajian In Vitro Embrio Sapi Bali untuk Menghasilkan Kualitas Embrio yang Layak Transfer (dibimbing oleh HERRY SONJAYA, SUDIRMAN BACO dan HASBI)

Tujuan penelitian adalah mengkaji produksi embrio sapi Bali secara *in vitro*. Tujuan penelitian terdiri dari empat bagian dengan tujuan spesifik: 1). Mengkaji vitrifikasi oosit sapi Bali, 2). Mengkaji embrio sapi Bali yang mampu mencapai tahap morula atau blastosis dan kaitannya dengan hidrogen peroksida (H_2O_2); 3). Mengkaji tingkat apoptosis sel pada embrio sapi Bali yang diproduksi secara *in vitro*; 4). Mengkaji faktor pertumbuhan pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur. Penelitian ini menggunakan ovarium yang berasal dari rumah potong hewan dan difertilisasi menggunakan semen yang berasal dari satu pejantan. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan nyata antar oosit yang divitrifikasi sebelum dimatangkan dan oosit yang divitrifikasi setelah dimatangkan ($P < 0,05$). Tingkat viabilitas oosit setelah dimatangkan lebih tinggi dibanding dengan oosit yang tidak dimatangkan sebelum vitrifikasi yaitu $63,74 \pm 4,82$ vs $76,27 \pm 1,81$, tingkat maturasi metafase II (MII) $19,81 \pm 1,62$ vs $30,50,22 \pm 8,29$ dan tingkat fertilisasi 2PN $32,02 \pm 6,44$ vs $45,36 \pm 6,02$. Embrio 2 sel tidak mampu mencapai morula, sedangkan tahap 4, 8 dan 16 sel mampu berkembang sampai tahap morula masing-masing 9,83%, 12,83% dan 25,00%. Konsentrasi H_2O_2 pada setiap kelompok sel tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hasil uji korelasi konsentrasi H_2O_2 dengan kemampuan embrio untuk mencapai tahap morula berkorelasi negatif yaitu semakin rendah konsentrasi H_2O_2 pada embrio peluang embrio untuk mencapai tahap morula semakin tinggi. Persentase embrio yang mengandung setidaknya 1 nukleus yang menunjukkan karakteristik tunel dari apoptosis yaitu 2 sel (28,33%), 4 sel (41,93%) 8 sel (43,48%) dan 16 sel (50%). EGF ditemukan pada cairan folikel dan media kultur embrio. FGF2 ditemukan pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur. Kesimpulan penelitian yaitu vitrifikasi oosit sebaiknya dilakukan setelah dilakukan pematangan oosit, Konsentrasi H_2O_2 yang tinggi menghambat perkembangan embrio, semakin cepat sel mengalami apoptosis semakin rendah tingkat kemampuan sel untuk berkembang lebih lanjut. Semakin tinggi persentase embrio yang mencapai morula semakin rendah konsentrasi *Growth Factor* dalam media.

Kata kunci: Embrio Sapi Bali, Hidrogen Perioksida, Apoptosis, *Growth Factor*, vitrifikasi, Fertilisasi *in vitro*

ABSTRACT

ERNI DAMAYANTI. Study of Bali Cattle Embryos to Produce Better Embryo Quality In Vitro (supervised HERRY SONJAYA, SUDIRMAN BACO and HASBI)

The aim of study was to examine the in vitro embryonic production of Bali cattle. The study consisted of four parts with specific objectives: 1). Assessing the vitrification of Bali cattle oocytes, 2). Assessing Bali cattle embryos that can reach the morula or blastocyst and their relation to hydrogen peroxide (H_2O_2); 3). Assessing the level of cell apoptosis in Bali cattle embryos produced in vitro; 4). Assessing growth factors in follicular fluid, maturation media and culture media. This study used ovaries from slaughterhouses and was fertilized using semen from one bull. The results showed that there was a significant difference between the vitrified oocytes before maturation and the vitrified oocytes after maturation ($P < 0.05$). The viability level of oocytes after vitrification was higher than that of oocytes that were not matured before vitrification, there are 63.74 ± 4.82 vs 76.27 ± 1.81 , metaphase II (MII) maturation rate 19.81 ± 1.62 vs 50.22 ± 8.29 and fertilization rate 2PN 32.02 ± 6.44 vs 45.36 ± 6.02 . The 2-cell embryo is not capable of reaching the morula, while stage 4-, 8- and 16-cell can develop to the morula stage of 9.83%, 12.83% and 25.00%, respectively. The concentration of H_2O_2 in each group of cells did not differ distinctly ($P > 0.05$). The results of the H_2O_2 concentration correlation test with the embryo's ability to reach the morula stage are negatively correlated, viz. The lower the concentration of H_2O_2 in the embryo, the higher the chances of the embryo reaching the morula stage. The percentage of embryos containing at least 1 nucleus that shows TUNEL characteristics of apoptosis is 2 cells (28.33%), 4 cells (41.93%) 8 cells (43.48%) and 16 cells (50%). Epidermal growth factor (EGF) is found in follicular fluid and embryo culture media. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is found in follicular fluid, maturation media and culture media. In conclusion, vitrification of oocytes should be carried out after oocyte maturation. High H_2O_2 concentrations inhibit embryonic development. The faster cells undergo apoptosis, the lower the level of cell ability to develop further. The higher the percentage of embryos that reach morula the lower the concentration of Growth Factor in the medium.

Keyword: Apoptosis, Bali cattle embryo, Growth Factor, Hydrogen Peroxide, In Vitro Fertilization, Vitrification,

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	Error! Bookmark not defined. i
HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	Error! Bookmark not defined.
UCAPAN TERIMAKASIH	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG	xv
BAB I	1
PENDAHULUAN UMUM	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Ruang Lingkup Penelitian.....	4
1.6 Kebaruan Penelitian (Novelty)	5
BAB II	6
Vitrifikasi Oosit Sapi Bali	6
2.1 Pendahuluan	6
2.2 Metode	8
2.2.1 Materi penelitian	8
2.2.2 Koleksi dan seleksi oosit	8
2.2.3 Vitrifikasi oosit	8
2.2.4 <i>Thawing</i> oosit.....	8
2.2.5 Maturasi oosit.....	9
2.2.6 Fertilisasi oosit	9
2.2.7 Evaluasi oosit.....	9

2.2.8 Analisis Data	10
2.3 Hasil dan Pembahasan.....	10
2.3.1 Hasil	10
2.3.2 Pembahasan	13
2.4. Kesimpulan.....	14
BAB III	15
Kemampuan Perkembangan dan Konsentrasi Hidrogen Peroksida (H ₂ O ₂) Embrio Sapi Bali yang di Kultur secara <i>in vitro</i>	15
3.1 Pendahuluan	15
3.2 Metode	17
3.2.1 Materi	17
3.2.2 Koleksi dan seleksi Oosit.....	17
3.2.3 Maturasi Oosit.....	17
3.2.4 Fertilisasi <i>in vitro</i>	17
3.2.5 Kultur <i>in vitro</i>	18
3.2.6 Pengukuran Hidrogen Peroksida (H ₂ O ₂)	18
3.2.7 Analisis Data	19
3.3 Hasil dan Pembahasan.....	19
3.3.1 Hasil	19
3.3.2 Pembahasan	22
3.4 Kesimpulan.....	25
BAB IV.....	26
Apoptosis pada Sel Embrio Sapi Bali yang di Produksi secara <i>In vitro</i>	26
4.1 Pendahuluan	26
4.2 Metode	28
4.2.1 Materi	28
4.2.2 Koleksi dan seleksi Oosit.....	28
4.2.3 Maturasi Oosit.....	29
4.2.4 Fertilisasi <i>in vitro</i>	29
4.2.5 Kultur <i>in vitro</i>	29
4.2.6 Fragmentasi DNA.....	30
4.2.7 Analisis Data	31
4.3 Hasil dan Pembahasan.....	31

4.3.1 Hasil	31
4.3.2 Pembahasan	33
4.4 Kesimpulan	35
BAB V	36
Profil <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) dan <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> (FGF2) pada Cairan Folikel, Media Pematangan dan Sapi Bali	36
Abstrak	36
5.1 Pendahuluan	36
5.2 Metode	38
5.2.1 Materi	38
5.2.2 Koleksi dan seleksi Oosit	38
5.2.3 Pematangan Oosit	38
5.2.4 Fertilisasi <i>in vitro</i>	39
5.2.5 Kultur <i>in vitro</i>	39
5.2.6 Koleksi Media	40
5.2.7 Metode pengukuran <i>growth factor</i>	40
5.2.8 Analisis Data	41
5.3 Hasil dan Pembahasan	41
5.3.1 Hasil	41
5.3.2 Pembahasan	44
5.4 Kesimpulan	48
BAB VI	49
PEMBAHASAN UMUM	49
BAB VII	54
KESIMPULAN UMUM	54
7.1 Kesimpulan	54
7.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
CURICULUM VITAE	71

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Viabilitas oosit sebelum dan sesudah vitrifikasi	11
2. Tingkat maturasi oosit sebelum dan sesudah vitrifikasi.....	12
3. Tingkat fertilisasi oosit sebelum dan sesudah vitrifikasi	13
4. Pembelahan sel embrio yang dikultur 48 jam setelah kultur	32
5. Perkembangan embrio kultur 48 jam setelah fertilisasi	42
6. Perkembangan embrio sapi bali setelah dikultur kembali selama 48 jam (96 jam setelah difertilisasi)	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Diagram penelitian tahap 1	10
2. A. Oosit sebelum dimaturasi B. oosit setelah dimaturasi C. oosit setelah divitrifikasi: a) viabel b) tidak viabel	11
3. Maturasi A. GV B. GVBD C. Metaphase-I D. Metaphase II.....	12
4. Tingkat Fertilisasi A. 1PN B. 2 PN C. >2 PN.....	13
5. Diagram penelitian tahap 2.....	19
6. Pembelahan embrio sapi Bali setelah kultur lanjutan 48 jam	20
7. Fluorescent photomicrographs	21
8. Konsentrasi H ₂ O ₂ embrio sapi Bali setelah kultur kembali 48 jam.....	21
9. Korelasi konsentrasi H ₂ O ₂ dengan kemampuan perkembangan embrio mencapai tahap morula setelah kultur kembali 48 jam.....	22
10. Diagram penelitian tahap 3.....	28
11. Persentase embrio yang mengandung setidaknya satu nukleus yang menunjukkan karakteristik (TUNEL) dari apoptosis (apoptosis inti).....	31
12. Deteksi apoptosis dan semua inti dalam embrio sapi oleh TUNEL (fluroscein isothiocyanate-conjugated dUTP; <i>Green channel</i>) dan propidium iodida (red channel), masing-masing, (a) 2 sel, (b) 4 sel, (c) 8 sel, (d) 16 sel. skala mewakili (abcd) 40 µm.....	32
13. Hubungan antara jumlah sel dan indeks apoptosis dalam embrio sapi Bali yang dihasilkan baik secara <i>in vitro</i> , r adalah koefisien korelasi untuk pengamatan yang dilakukan.....	33
14. Diagram penelitian tahap 4.....	41
15. Perkembangan embrio sapi Bali, A) 2 sel, B) 4 sel, C) 8 sel dan D)16 sel. Skala bars (40 µm) pembesaran 200x	42
16. Profil Growth Factor pada cairan Folikel dan media kultur sapi Bali EGF dan FGF2	44
17. Hubungan korelasi konsentrasi growth factor dengan kemampuan embrio untuk Mencapai morula setelah kultur kembali (%)	44

DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
COC	Cumulus oocyte complex
H ₂ O ₂	Hidrogen perioksida
ROS	Reaktif oksidatif spesies
TE	Transfer embrio
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO	Denuned oocyte
ng	Nano gram
CO ₂	Karbondioksida
μ	Mikro
hCG	Human chorionic gonadotrophin
PMSG	Pregnant mare serum gonadotrophin
IVF	<i>In vitro</i> Fertilization
PBS	Phosphate buffered saline
FBS	Fetal bovine serum
BSA	Bovine Serum Albumin
Rpm	Rotation per minute
RPH	Rumah Potong Hewan
DCHFDA	2',7'-dichlorodihydro-fluorescein Diacetate
TUNEL	Terminal dUTP nick-end labelling
OPU	Ovum pick up
PI	Propidium iodine
Nm	Nanometer
MII	Metaphase II
ICM	Inner cell mass
FGF2	Basic fibroblast growth factor
EGF	Epidermal growth factor
IGF1	Insulin like growth factor 1
GSH	Gluthatione
DMSO	Dimethyl Sufoxide
EG	Etilen Glicol

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Sapi Bali merupakan sapi lokal asli Indonesia yang banyak dikembangkan oleh masyarakat peternak. Salah satu cara untuk mempertahankan kualitas dan kuantitas sapi Bali adalah pemanfaatan teknologi berbantuan yaitu produksi embrio secara *in vitro*. Produksi embrio secara *in vitro* dapat dilakukan dengan memanfaatkan limbah ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH) (Abraham *et al.*, 2012). Produksi embrio sapi Bali secara *in vitro* masih perlu dilakukan perbaikan untuk mendapatkan embrio berkualitas yang dapat menunjang keberhasilan transfer embrio. Kualitas embrio *in vitro* dapat dicapai dengan adanya keseragaman pembelahan pada sel untuk mencapai blastosis. Keberhasilan produksi embrio *in vitro* biasanya dinilai dari jumlah embrio yang mencapai tahap morula atau blastosis dan kemampuan embrio yang dihasilkan untuk *recovery* kembali setelah dilakukan kriopreservasi. Pembekuan pada oosit dapat menyebabkan oosit mengalami *cold shock* sehingga kemampuan untuk *recovery* rendah. Untuk menghindari tersebut maka digunakan krioprotektan Malenko *et. al.* (2017). Sopiyan (2006) bahwa krioprotektan yang dapat digunakan dalam pembekuan embrio yaitu *Etilen Glikol* (EG), *Dimethyl Sufoxide* (DMSO) dan *Sucrose*. Selain itu mengingat vitrifikasi merupakan juga perlu dilakukan pengkajian terhadap oosit sapi Bali yang diproduksi secara *in vitro*.

Studi pendahuluan bahwa terdapat perbedaan perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro* selama di kultur, pada lama kultur yang sama beberapa embrio yang berkembang berbeda, pada umur 2 hari bervariasi yaitu dari 2 sel, 4 sel, 8 sel hingga mencapai 16 sel (Sonjaya dan Hasbi, 2019), sedangkan menurut Gordon (2003) bahwa hari ke 1-2 hari setelah fertilisasi embrio berkembang menjadi 1 sampai 2 sel, umur 2-3 hari mencapai 4 sel. Setelah proses fertilisasi *in vitro*, proporsi zigot yang dapat berkembang hingga ke tahap blastosis selama kultur sekitar 30-40% (Rizos *et.al.*, 2002). Kualitas intrinsik oosit dan lingkungan atau media kultur setelah fertilisasi merupakan faktor utama yang sangat memengaruhi kemampuan perkembangan hingga ke tahap blastosis (Feugang *et.al.* 2009). Lebih lanjut di jelaskan bahwa embrio sangat rentan terhadap berbagai stress *in vitro* termasuk diantaranya dapat disebabkan oleh

formulasi media yang tidak tepat, suplementasi media, masalah dalam sistem kultur, masalah teknis atau kurangnya kontrol kualitas yang tepat dan jaminan kualitas.

Berbagai faktor yang perlu diketahui dalam produksi embrio secara *in vitro* diantaranya adalah hubungannya dengan hidrogen peroksida (H_2O_2), apoptosis dan *Growth Factor*. Sistem kultur embrio *in vitro* belum mampu di kondisikan menyerupai *in vivo* dengan baik sehingga dapat menyebabkan peningkatan reaktif oksigen spesies (Agarwal *et al.*, 2006). ROS menghasilkan oksigen radikal bebas seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) hidroksil radikal (OH) dan radikal anion superoksida (O_2) serta merupakan produk sampingan dari metabolisme sel (Takahashi, 2012). Oosit yang mengalami stress oksidatif dapat menyebabkan masalah selama meiosis (Perkins *et al.*, 2016) dan peningkatan fragmentasi pada embrio (Arias *et al.*, 2012). Embrio abnormal yang dihasilkan secara *in vitro* memicu penuaan pada tingkat sel dengan memasuki penghentian siklus sel dan menunjukkan metabolisme aktif dan tingkat reaktif oksigen spesies (ROS) yang tinggi (Nandi *et al.*, 2019).

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terencana yang ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimuli fisiologis maupun patologis (Zeiss, 2003). Apoptosis merupakan proses aktif yang memerlukan energi karena prosesnya terjadi oleh sel sendiri hingga mengakibatkan kematian sel (Chang dan Yang, 2000). Terjadinya apoptosis pada sel sapi Bali diduga dapat menghambat perkembangan sel pada embrio.

Perkembangan embrio sapi Bali juga diduga berkaitan dengan faktor pertumbuhan. Mani *et al.* (2010) melaporkan bahwa salah satu faktor pertumbuhan yang dapat digunakan dalam produksi embrio secara *in vitro* yaitu IGF-I. IGF-I merupakan stimulator utama proliferasi seluler, diferensiasi dan perkembangan sel, regulasi proses steroidogenesis oleh sel-sel granulosa dan apoptosis selama perkembangan folikel. Selain itu, IGF-I juga berperan menginduksi proses pembelahan mitosis pada sel-sel granulosa (Spanos, *et al.*, 2000), Beberapa *Growth Factor* yang berpengaruh dalam produksi embrio yaitu *Epidermal Growth Factor* (EGF) plus *fibroblast growth factor* (FGF) dan *Stem Cell Factor* (SCF) (Suthar *et al.*, 2009, Dhali *et al.*, 2011). Untuk menghasilkan embrio yang seragam maka perlu diketahui karakteristik morfologi, fisiologi maupun biokimia dari embrio sapi Bali yang diproduksi secara *in vitro* dan

hubungannya dengan *Growth Factor*. Oleh karena itu pada penelitian ini akan mengkaji keseragaman pembelahan hubungannya dengan konsentrasi hidrogen peroksida, apoptosis dan *Growth Factor* pada embrio sapi Bali perlu dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Pemanfaatan ovarium sapi Bali dari rumah potong hewan (RPH) masih sangat terbatas. Oosit dari rumah potong hewan dapat dibekukan atau langsung difertilisasi setelah dimatangkan secara *in vitro*. Penelitian mengenai kriopreservasi oosit (pembekuan oosit) pada sapi Bali Masih sangat terbatas. Pembekuan juga perlu dilakukan pengkajian mengingat pentingnya proses pembekuan dalam mempertahankan kualitas oosit atau embrio selama pembekuan. Pembelahan sel pada produksi embrio sapi Bali secara *in vitro* terdapat ketidakseragam pada umur 2 hari kultur dan embrio yang dapat mencapai morula dan blastosis masih sangat rendah. Hal ini perlu dilakukan pengkajian mengenai perkembangan embrio pada sapi Bali yang di produksi secara *in vitro* dan hubungannya dengan hidrogen peroksida (H_2O_2), apoptosis, hormon pertumbuhan (EGF dan FGF2). Berdasarkan latar belakang perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro* memiliki kajian yang masih sangat terbatas untuk menghasilkan embrio yang baik sehingga rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu

- 1) Bagaimana pengaruh vitrifikasi terhadap kualitas oosit sapi Bali?
- 2) Bagaimana kemampuan perkembangan embrio dari tahapan perkembangan embrio yang berbeda-beda secara *in vitro* dan kaitannya dengan konsentrasi hidrogen peroksida (H_2O_2)?
- 3) Bagaimana hubungan perkembangan embrio dengan apoptosis pada sel embrio Sapi Bali secara *in vitro*?
- 4) Bagaimana peranan *Growth Factor* pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur dalam merangsang dan meningkatkan jumlah embrio pada sapi Bali?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Mengkaji dan menganalisis pengaruh vitrifikasi oosit pada sapi Bali

- 2) Mengkaji embrio sapi Bali yang mampu mencapai tahap morula atau blastosis dari tahapan pembelahan embrio yang berbeda-beda secara *in vitro* dan kaitannya dengan hidrogen peroksida.
- 3) Mengkaji apoptosis pada sel embrio sapi Bali yang diproduksi secara *in vitro*
- 4) Mengkaji dan menganalisis faktor *Growth Factor* (EGF dan FGF2) yang dapat medium kultur untuk meningkatkan jumlah embrio yang dapat mencapai morula atau blastosis.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini yaitu diharapkan mendapatkan referensi mengenai vitrifikasi oosit sehingga bisa diaplikasikan di berbagai daerah sentra sapi potong, terdapatnya informasi mengenai kecepatan pembelahan embrio sapi Bali yang di produksi secara *in vitro* dengan pengelompokan jumlah sel dihari umur kultur 2 hari dalam mencapai morula atau blastosis sehingga menghasilkan embrio yang berkualitas dan layak transfer. Selain itu dengan adanya penelitian ini dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dibidang peternakan.

1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Secara umum terdapat pendekatan untuk mengetahui pengaruh vitrifikasi terhadap kualitas oosit, mengetahui hubungan perkembangan embrio dengan hidrogen peroksida dan apoptosis pada sel serta EGF dan FGF2 pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur embrio. Dalam penelitian ini dilakukan pengelompokan sel yang merupakan salah satu alternatif untuk melihat kemampuan embrio dalam mencapai morula atau blastosis. Penelitian ini dilakukan dengan 4 tahapan kegiatan yaitu:

Tahap pertama yaitu vitrifikasi oosit sapi Bali, Tahap kedua kultur embrio sapi Bali secara *in vitro* dengan pengelompokan berdasarkan jumlah sel embrio di umur 2 hari kultur dan kaitannya dengan hidrogen peroksida. Tahap Ketiga kultur embrio berdasarkan jumlah sel dan kaitannya dengan apoptosis. Tahap keempat yaitu kajian EGF dan FGF2 pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur embrio sapi Bali.

1.6 Kebaruan Penelitian (Novelty)

Kebaruan dari penelitian yaitu melaporkan tentang vitrifikasi oosit pada sapi Bali. Produksi embrio sapi Bali secara *in vitro* dengan pengelompokan sel berdasarkan jumlah sel. Selain itu laporan mengenai konsentrasi hidrogen peroksida dan apoptosis pada embrio sapi Bali pertama kali dilaporkan serta konsentrasi *Growth Factor* (EGF dan FGF2) pada cairan folikel, media maturasi dan media kultur juga pertama dilaporkan. Penelitian ini juga memahami teori yang menyebabkan perbedaan perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro*.