

**PENGARUH PENAMBAHAN *INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM* (ITS)  
TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI BALI  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MUHAMMAD NASRULLAH  
I111 13 032**



**FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**



**PENGARUH PENAMBAHAN *INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM* (ITS)  
TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI BALI  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MUHAMMAD NASRULLAH  
I111 13 032**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana  
Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin**

**FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**



## PERNYATAAN KEASLIAN

1. Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muhammad Nasrullah

NIM : 1111 13 032

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa :

- a. Karya skripsi yang saya tulis adalah asli
  - b. Apabila sebagian atau seluruhnya dari karya skripsi ini, terutama bab Hasil dan Pembahasan tidak asli atau plagiasi maka bersedia dibatalkan atau dikenakan sanksi akademik yang berlaku
2. Demikian pernyataan keaslian ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Makassar, September 2020



*Muhammad Nasrullah*  
Muhammad Nasrullah



HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Pengaruh *Insulin Transferrin Selenium (ITS)*  
Pada Medium Terhadap Sapi Bali Secara *In Vitro*  
Nama : Muhammad Nasrullah  
Nomor Induk Mahasiswa : 1111 13 032  
Fakultas : Peternakan

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

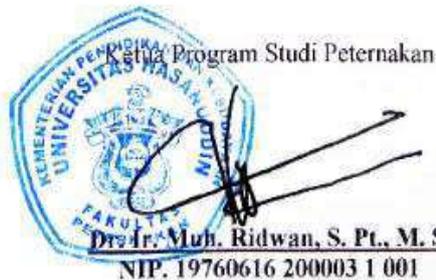


Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DES, DEA  
NIP. 19570129 198003 1 001



Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Tolleng, M.Sc.  
NIP. 195406021978021001

Ketua Program Studi Peternakan



Dr. Ir. Muh. Ridwan, S. Pt., M. Si  
NIP. 19760616 200003 1 001

Tanggal Lulus: September 2020



## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

Segala puja dan puji bagi Allah SWT atas Rahmat dan Hidayah-Nya yang senantiasa tercurahkan kepada penulis sehingga dapat merampungkan penulisan Skripsi ini. Shalawat dan salam kepada junjungan Nabi Muhammad SAW yang telah menjadi panutan serta telah membawa ummat dari lembah kehancuran menuju alam yang terang benderang.

Dalam setiap helai kelopak bunga dan semerbak wangi yang dipancarkan olehnya, penulis haturkan terima kasih kepada Ibunda **Rosmayani**, Ibu, yang telah memberikan penulis hidup, menegakkan punggung, melangkahkan kaki, menampung setiap keluh-kesah untuk kemudian menggantikannya dengan kasih sayang, yang rela menebus dirinya dengan kepayahan dan air mata sehingga penulis dapat tegap menelusuri jalan kehidupan, mampu pongah terhadap muslihat dunia, dan mencoba teguh berpegang pada kebenaran. Dan kepada Ayahanda **Syamsuddin**, Ayah, atas kepercayaan penuh yang diberikan kepada penulis sebagai “anak sejati”. Semoga ananda dapat mempersembahkan yang terbaik kepada Ayah dan Ibu.

Terima kasih tak terhingga kepada bapak **Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DES, DEA** selaku Pembimbing Utama yang telah membimbing penulis, memberi motivasi dan telah memberi/membagi pengetahuannya kepada penulis dan kepada

**Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Tolleng, M.Sc.**, selaku Pembimbing Anggota sahaja dalam mengoreksi dan memperbaiki tulisan skripsi ini.



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

1. Ibu Rektor UNHAS, Bapak Dekan, Pembantu Dekan I, II dan III dan seluruh Bapak Ibu Dosen yang telah melimpahkan ilmunya kepada penulis, serta Bapak Ibu Staf Pegawai Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin yang selalu melayani kebutuhan administrasi penulis.
2. Bapak **Dr. Hasbi, S.Pt, M.Si** yang telah mengajarkan teknik mencacah ovarium hingga proses pengamatan inti dan membantu kami selama penelitian ini.
3. **Jamilah, S.Pt, M.Si.** selaku penasehat akademik penulis yang telah memberikan bimbingan selama masa perkuliahan penulis.
4. Rekan-rekan sepenelitian yaitu **Hikmayani Iskandar, Nawawi, Andi Nurul Airin, Dewi Sartika, Asri Puspita dan Hilma Utami Putri** yang telah mencurahkan segenap tenaga, waktu, materi dan perhatiannya selama penelitian ini.
5. Sahabat-sahabat terbaik penulis selama di Fakultas Peternakan, terutama **Nur Astuti, Andi Nurul Airin, Muslimin, Nawawi Arfan, Muhammad Danial, Andi Nurul Hikmah, Nunung Rahmatullah Syariwati, Muhtar, Andika Gunawan, Keluarga Besar Larfa dan pondok Mario.**
6. Terima kasih khusus kepada kakanda **Mahmud Rizal** yang telah banyak membantu, menasehati dan memotivasi saya dalam proses penyelesaian

si ini.



7. Kakanda **Muslimin dan Nawawi** di Fakultas Peternakan yang selalu memberikan motivasi.
8. Organisasi tercinta selama menjadi mahasiswa di Fakultas Peternakan yaitu **BEM PETERNAKAN-UH dan HIMAPROTEK-UH** yang menjadi wadah bagi penulis untuk berproses dan belajar.
9. Buat semua kawan-kawan yang belum sempat disebutkan namanya, namun telah memberi andil kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini mohon maafku, dan terima kasihku untukmu semuanya.

Dengan sangat rendah hati, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik serta saran pembaca sangat diharapkan adanya oleh penulis demi perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan nantinya, terlebih khusus di bidang peternakan. Semoga makalah skripsi ini dapat memberi manfaat bagi para pembaca terutama bagi penulis itu sendiri.

AAMIIN YA ROBBAL AALAMIN.

Akhir Qalam *Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.*

Makassar,      September 2020

Penulis,

Muhammad Nasrullah



## ABSTRAK

**Muhammad Nasrullah I111 13 032. Pengaruh Penambahan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) Terhadap Perkembangan Embrio Sapi Bali Secara *In Vitro*. Pembimbing : Herry Sonjaya dan Abd. Latief Tolleng**

Selama proses perkembangan embrio, sel embrio menghasilkan ROS sebagai hasil samping dari proses metabolisme yang menghambat perkembangan sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) terhadap perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan lanjutan dari IVM, IVF dan dilanjutkan dengan kultur embrio. Penelitian ini menggunakan analisis dengan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 kali ulangan dengan penambahan ITS. Perlakuan ini terdiri dari, P0 kontrol; P1 (5 ng/ml); P2 (10 ng/ml); dan P3 (15 ng/ml). Parameter yang diamati yaitu tahap tingkat perkembangan embrio sapi Bali hingga ke tahap Blastosis dan Morula pasca fertilisasi dengan lama kultur 48 jam dan 96 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ITS tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perkembangan embrio sapi Bali, namun lama waktu kultur embrio mampu memberikan pengaruh positif terhadap perkembangan embrio hingga ke tahap 32 sel.

Kata Kunci : Ovarium Sapi Bali, *Insulin Transferrin Selenium*, Fertilisasi, Tingkat Perkembangan Embrio

## ABSTRACT

**Muhammad Nasrullah I1113032. The Effect of *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) Addition to the Embryo's Development of Balinese Cattle *In Vitro*. Supervised by Herry Sonjaya and Abd. Latief Tolleng.**

During the embryonic development process, embryonic cells produce ROS (*Reactive Oxygen Species*) as by-product of metabolic processes that inhibit cell. This study aims to determine The Effect of *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) Addition to the Embryos Development of Balinese Cattle *In Vitro*. This research is a continuation of IVM, IVF and continued with embryo culture. This research uses an analysis with a completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 4 replications with ITS addition. This treatment consists, T1 control; T2 (5 ng/ml), T3 (10 ng/ml), and T4 (15 ng/ml). The parameters observed were the embryos development phase of Bali cattle embryo to the Blastosis and Morula phase after fertilization culture with 48 hours and 96 hours. The results showed that the ITS addition did not have a significant effect to the embryo development of Balinese cattle, but the culture length time of the embryo make the positive influence on the embryo development up to the 32 cell stage.

Keywords: Ovarium, *Insulin Transferrin Selenium*, Fertilization, Embryo Development.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
PENDAHULUAN.....	1
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
Perkembangan Folikel dan Oogenesis.....	5
Maturasi <i>In Vitro</i> .....	9
Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	11
Perkembangan Embrio <i>In Vitro</i> .....	13
<i>Insulin Transferrin Selenium (ITS)</i> .....	14
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Perkembangan Embrio Secara.....	15
METODE PENELITIAN.....	18
Waktu dan Tempat.....	18
Materi Penelitian.....	18
Prosedur Penelitian.....	19
Parameter yang Diamati.....	21
Analisis Data.....	22



<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
Pengaruh Pemberian Insulin Transferrin Selenium Terhadap Perkembangan Embrio Sapi Bali .....	25
<b>PENUTUP .....</b>	<b>33</b>
Kesimpulan.....	33
Saran.....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>34</b>
<b>LAMPIRAN</b>	
<b>RIWAYAT HIDUP</b>	



## DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
1	Tingkat tahapan perkembangan Embrio pada berbagai perlakuan selama 48 Jam .....	25
2	Tingkat tahapan perkembangan Embrio pada berbagai perlakuan selama 48 Jam .....	27



## DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
1	Diagram Alir Prosedur Penelitian.....	19
2	Morfologi oosit selama proses perkembangan.....	23
3.	Persentase perkembangan embrio berdasarkan perlakuan ITS dan waktu kultur embrio.	29



## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1: Analisis Rancangan Acak Lengkap Kultur Embrio 48 Jam
- Lampiran 2: Analisis Rancangan Acak Lengkap Kultur Embrio 96 Jam
- Lampiran 3: Dokumentasi Penelitian



## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Dewasa ini, bioteknologi berkembang dengan sangat pesat, terutama di negara-negara maju. Kemajuan ini ditandai dengan ditemukannya berbagai macam teknologi seperti rekayasa genetika, kultur jaringan, pengembangbiakan sel induk, kloning, teknologi transfer embrio, dan teknologi-teknologi reproduksi lainnya. Bioteknologi reproduksi merupakan satu kesatuan dari teknik-teknik rekayasa system reproduksi hewan yang dikembangkan melalui suatu proses penelitian dalam bidang reproduksi hewan secara terus menerus dan berkesinambungan dengan hasil berupa alat dan metoda yang dapat diaplikasikan dengan tujuan untuk meningkatkan produktivitas.

Peningkatan produktivitas ternak dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, salah satunya adalah dengan menerapkan teknologi fertilisasi *in vitro*. Sumber oosit yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* ini umumnya memanfaatkan ovarium dari ternak hasil pemotongan RPH (Rumah Pemotongan Hewan). Ketersediaan sel telur atau oosit dengan kualitas baik dalam jumlah banyak juga perlu diperhatikan. Kualitas oosit sangat berpengaruh terhadap keberhasilan proses fertilisasi *in vitro*. Kekompakan dari bentukan kumulus ophorus dan ooplasma yang homogen serta adanya zona pelucida yang intak merupakan morfologi oosit yang mempunyai kualitas bagus untuk dapat bisa

maturasi secara *in vitro* atau *in vitro maturation* (IVM).



Perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro* yang baik bergantung pada tingkat kematangan pada oosit dan suplemen-suplemen dalam media yang ditempatinya sehingga proses-proses fisiologi seperti metabolisme sel embrio dapat berlangsung dengan baik. Namun, proses metabolisme energi dalam sel akan menimbulkan masalah lain yaitu dengan dihasilkannya produk sampingan berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan cekaman kimiawi pada embrio sapi Bali. ROS ini merupakan zat kimia yang masuk dalam kelompok radikal bebas. Radikal bebas merupakan senyawa kimia yang tidak stabil dan sangat reaktif dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga untuk memperoleh pasangan elektronnya senyawa ini akan bereaksi dengan molekul lain seperti asam lemak tak jenuh, protein, asam nukleat, dan lipopolisakarida. Keberadaan ROS ini dalam jumlah berlebihan akan menimbulkan efek negatif salah satunya yaitu akan membunuh sel. Maka dari itu, untuk menghambat pembentukan radikal bebas diperlukan zat antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang mampu memperlambat proses oksidasi molekul kimia lain seperti vitamin A, vitamin C, dan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) (Cordova et al., 2010).

Insulin adalah hormon polipeptida yang dapat meningkatkan penyerapan glukosa, asam amino, serta memiliki efek mitogenik. Transferin dan Selenium yang bekerja sebagai antioksidan dalam sistem biologis. Insulin-transferin-selenium (ITS) secara bersama-sama mampu bekerja sebagai suplemen yang

membantu perkembangan embrio secara *in vitro* dengan cara merangsang an glukosa serta menghambat terjadinya kerusakan-kerusakan sel yang



disebabkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*). Penggunaan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) dalam medium pematangan oosit (IVM) pernah diuji-cobakan pada oosit kambing secara *in vitro* yang ternyata berpengaruh positif terhadap tingkat kematangan oosit dilihat dari sel kumulus oosit kambing yang mampu berekspansi dengan sempurna (Firmiaty *et al*, 2014). Penambahan penambahan Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada medium maturasi dan fertilisasi oosit sapi Bali secara *in vitro* menunjukkan pemberian ITS sebanyak 5 ng/ml menghasilkan tingkat maturasi yang terbaik dan untuk tingkat fertilisasi yang terbaik cenderung pada pemberian ITS sebanyak 15 ng/ml (Hikmayani *et al* 2019). Namun pengaruh pemberian ITS pada medium kultur embrio sapi bali secara *in-vitro* dan bagaimana dampaknya terhadap perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro* belum diteliti.

### **Rumusan Masalah**

Pada saat embrio dikultur secara *in-vitro* setelah proses fertilisasi, metabolisme embrio berkembang dengan kondisi O<sub>2</sub> pada konsentrasi yang lebih tinggi. Kondisi ini memicu peningkatan produksi radikal bebas (*Reactive Oxygen Species* / ROS) yang mengakibatkan kondisi stres oksidatif. Tingkat ROS yang tinggi ini dapat merusak membran sel karena antioksidan membran lipid. Sistem antioksidan enzimatik ditemukan dalam sel mamalia, yaitu superoxide dismutase, glutathione peroxidase, dan katalase dapat berfungsi sebagai penghilang ROS.

Oleh karena itu, penambahan antioksidan diperlukan dalam proses pematangan

untuk menghambat kerusakan sel akibat ROS dan meningkatkan laju pembelahan sel dalam oosit. Suplemen antioksidan seperti  $\alpha$ -tocopherol,



glutathione (GSH) dan Insulin Transferrin Selenium (ITS) ditambahkan ke medium kultur embrio dengan tujuan menghilangkan radikal bebas. Penelitian pada beberapa hewan, telah menunjukkan pemberian insulin dan kombinasi insulin Transferin dan selenium ke dalam media, dapat meningkatkan potensi pertumbuhan oosit, tingkat pembelahan embrio selama maturasi *in vitro*, dan *in vitro* Cultured pada babi dan tikus ((Kim et al. 2005; Lee et al. 2005). Penambahan ITS pada media kultur embyo sapi Bali diharapkan memberikan respon yang lebih baik.

### **Tujuan Penelitian**

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) pada medium kultur CR1aa terhadap tingkat perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro*.

### **Kegunaan Penelitian**

Hasil dari penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai perkembangan embrio hasil penambahan ITS sehingga dapat diaplikasikan untuk mendukung pemanfaatan ovarium bagi pembentukan bank gamet/embrio serta mendukung tingkat produksi sapi melalui teknologi reproduksi bantuan.

### **Hipotesis**

Berdasarkan kerangka pemikiran maka dapat diambil hipotesis :

H1: Penambahan *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) mampu meningkatkan perkembangan embrio secara *in vitro*.



## TINJAUAN PUSTAKA

### Perkembangan Folikel dan Oogenesis

Proses pertumbuhan folikel, ovulasi dan pembentukan CL sangat dipengaruhi oleh sirkulasi hormon reproduksi dalam tubuh. Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) yang dihasilkan oleh hypothalamus berfungsi menstimulasi pengeluaran follicle stimulating hormone (FSH) dan luteinizing hormone (LH) oleh hipofisa anterior sebagai respons terhadap estrogen atau progesteron. Ketika proses pertumbuhan folikel kecil (Recruitment) berlangsung, mRNA meningkat. Pada saat seleksi morfologis, folikel dominan mengandung estrogen dengan konsentrasi tinggi dalam cairan folikel dan segera setelah proses seleksi berakhir, maka folikel dominan banyak mengandung mRNA untuk reseptor gonadotrophin dan hormon steroid (Fortune, 1994).

Perkembangan folikel pada sapi dan domba ditandai dengan adanya gelombang pertumbuhan folikel. Satu gelombang didefinisikan sebagai suatu proses pertumbuhan folikel yang sinkron dari beberapa folikel kecil. Dari kelompok folikel kecil tersebut, salah satu diantaranya akan terseleksi dan tumbuh menjadi folikel dominan, sedangkan folikel lainnya akan terhenti pertumbuhannya dan menuju atresi. Setelah mencapai ukuran maksimal, folikel dominan juga akan mengalami atresi dan regresi. Perkembangan folikel pada sapi dan domba ditandai dengan adanya gelombang pertumbuhan folikel. Pada gelombang yang kedua

dominannya akan menjadi folikel ovulatory sedangkan folikel dominan gelombang ketiga akan mengalami ovulasi (Fortune, 1994).



Folikulogenesis adalah proses perubahan yang ditandai dengan adanya perubahan proliferasi dan differensiasi komponen sel pada folikel. Dinamika folikel terjadi selama folikel merupakan perubahan tahap perkembangan folikel mulai dari folikel primordial sampai folikel tersier termasuk perubahan ekspresi mRNA yang mengkode reseptor GnRH, hormon steroid dan diikuti seleksi folikel. Perkembangan folikel akan menyediakan lingkungan yang optimal untuk maturasi oosit sehingga siap untuk fertilisasi. Folikulogenesis berhubungan dengan perkembangan sekelompok folikel dengan berbagai tahap perkembangan, kemudian sejumlah folikel akan terseleksi untuk berkembang lebih lanjut (Armstrong and webb, 1997). Folikulogenesis dapat dibagi menjadi tiga tahap:

1. Rekrutmen, tahap pertumbuhan pool folikel yang cepat. Pertumbuhan ini terjadi dari folikel primordial menjadi folikel primer dan folikel sekunder.
2. Seleksi, proses penseleksian folikel untuk pertumbuhan lebih lanjut menjadi folikel subordinat.
3. Dominasi, proses perkembangan folikel dominan yang cepat dan perkembangan folikel subordinat akan tertekan oleh folikel dominan. Dominasi folikel dan penghambatan pertumbuhan folikel subordinat disebabkan oleh meningkatnya *follicle development inhibiting factor* (FGIF) yang diproduksi oleh folikel dominan. FGIF akan menghambat proliferasi sel granulosa yang menstimulasi FSH dan aktivitas aromatase, selain itu juga menghambat vaskularisasi folikel subordinat.

Selain hormon, proses folikulogenesis dikontrol oleh faktor endokrin atau faktor seperti *development factor* misalnya *insulin-like development factor*



(IGF), *Transforming Development factor* (TGF), *Fibroblast Development Factor* (FGF) dan *Epidermal Development Factor* (EGF). IGF berfungsi untuk menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel granulosa dan sel theca.

Hormon gonadotropin pada level seluler TGF berperan untuk menghambat fragmen sel granulosa dan sel theca FGF akan menstimulasi proliferasi sel theca, menghambat stimulasi FSH yang menginduksi ekspresi reseptor LH pada sel granulosa, dan mereduksi ikatan IGF pada jaringan techa. FGF bersama *Extra Celluler Matrix* (ECM) dapat mengatur stabilitas dan penggabungan Development Factor (Amstrong dan Webh, 1997).

Menurut McGee dan Hsueh (2000), ada dua tahap utama yang terjadi pada perkembangan folikel yaitu *initial recruitment* dan *cyclic cecruitment*. *Initial recruitment* adalah perkembangan folikel yang berlangsung terus-menerus mulai dari pembentukan folikel sampai sebelum masa pubertas. Perkembangan ini terjadi pada folikel tahap primordial, dimana perkembangan folikel tidak mempengaruhi hormon gonadotropin. Folikel akan berkembang dari berkembang akan mengalami dormansi. Oosit mulai tumbuh namun perkembangan tidak mencapai *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Sedangkan *cyclic recruitment* dimulai setelah masuk masa pubertas. Perkembangan terjadi pada folikel tahap antral dimana perkembangan telah dipengaruhi oleh FSH dan LH. Folikel yang tidak berkembang akan mengalami atresi. Oosit berkembang sempurna dari mampu mencapai tahap *germinal vesicle breakdown* (GVBD).



folikel primordial terdiri atas satu oosit primer yang dibungkus oleh sel folikel pipih yang saling melekat melalui desmosom, kemudian dilapisi

oleh sebuah membran basal yang merupakan batas antara folikel avaskular dan stroma di sekitarnya. Selama siklus birahi, terjadi perubahan struktur dari folikelfolikel sampai akhirnya mencapai folikel de graff, perkembangan folikel melibatkan perubahan pada sel-sel folikel, oosit primer dan stroma di sekitar.

Oogenesis adalah suatu proses pembentukan, pertumbuhan dan pematangan dari gamet betina. Dimulai sejak embrional sampai setelah dilahirkan dan mencapai puncaknya pada saat ovulasi (Austin dan short, 1982).

Proses pembentukan sel kelamin betina terdiri dari dua tahap. Tahap yang pertama adalah periode proliferasi yang terjadi pada saat prenatal sampai sebelum atau sesaat setelah fetus dilahirkan. Selama itu proses yang terjadi adalah sel benih primordial mengalami diferensiasi menjadi oogenia dan mengalami pembelahan mitosis. Beberapa oogenia akan terus bermitosis dan berdiferensiasi menjadi oosit primer. Oosit primer dengan inti pada tahap profase I dan dikelilingi sel epitel disebut folikel primordial (Hafez, 2000). Menjelang lahir semua inti oosit primer telah selesai membelah dan tertahan pada profase I tahap diploten. Inti oosit pada tahap ini dicirikan dengan adanya membrane inti yang utuh dan nucleolus yang jelas disebut germinal vesicle (GV) (Van den Hurk,et al.,1997).

Pertumbuhan oosit terbagi dua fase. Fase I oosit tumbuh cepat dan erat hubungannya dengan perkembangan folikel ovarium. Pada folikel primordial aktivitas proliferasi sel epitel pipih yang mengelilingi sel telur akan dimulai dengan membentuk satu lapis sel kuboid yang mengelilingi sel telur dan disebut

primer. Sel kuboid akan terus berproliferasi membentuk multilayer sel yang akan mengelilingi sel telur dan tahap ini disebut dengan folikel



sekunder. Proliferasi akan terus berlanjut hingga folikel membentuk antrum folikuli yang disebut folikel tersier (Van den Hurk et al., 1997). Folikel tersier akan dikelilingi oleh sel teka internal dan eksternal yang menghasilkan estrogen. Antrum folikuli akan bertambah besar seiring dengan perkembangan sel folikel tersier. Pertumbuhan folikel selanjutnya akan tergantung pada hormon gonadotropin untuk mencapai folikel de graaf yang diakhiri dengan proses ovulasi. Bertambah besar diameter folikel ovarium merupakan ciri dari fase II. Pertumbuhan folikel dalam ovarium dipengaruhi oleh hormon Gonadotropin serta sekresi hormon dari sel granulosa dan sel teka (Hafez, 2000).

### **Maturasi *In Vitro* (IVM)**

Pematangan oosit baik secara *in vivo* atau *in vitro* meliputi pematangan inti dan sitoplasma. Proses pematangan inti dan sitoplasma merupakan hal yang penting bagi oosit untuk mendukung keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio (Rodriguez & Farin 2004). Oosit mamalia setelah dilepaskan dari folikel ovarium dapat melanjutkan pematangan inti secara spontan di dalam medium kultur secara *in vitro*. Pematangan oosit secara *in vitro* dilakukan agar oosit primer dapat menyelesaikan proses meiosis sehingga berkembang menghasilkan oosit sekunder yang haploid dan mempunyai kemampuan untuk berhasil terfertilisasi dan mendukung perkembangan embrio selanjutnya (Hyttel *et al.* 1997).

Proses pematangan inti ditandai dengan perubahan inti dari tahap diploten

meiosis I ke metafase II (Whitaker 1996) yang ditunjukkan dengan an membran inti melewati *germinal vesicle*, kondensasi kromosom,



pelepasan polar bodi I dan istirahat pada metafase II. Pada saat diovulasikan oosit berada pada tahap istirahat metafase II sampai terjadi aktivasi pada oosit untuk melanjutkan perkembangan. Inisiasi atau awal meiosis pada oosit dikontrol oleh *maturatation/m-phase promoting faktor* (MPF) yang aktivitasnya meningkat pada saat *germinal vesicle breakdown* (GVBD), maksimum pada metafase I dan menurun pada metafase II (Crozet *et al.* 2000).

Proses pematangan sitoplasma melibatkan akumulasi mRNA maternal dan perubahan molekuler dan structural antara lain peningkatan yang pesat terhadap jumlah dan ukuran organel seperti ribosom, butir lemak, golgi, mitokondria dan butir korteks sehingga oosit memiliki kemampuan untuk mendukung proses fertilisasi dan perkembangan embrio (Ebner *et al.* 2003). Kedua pematangan ini harus terjadi sehingga oosit mempunyai kemampuan untuk mendukung perkembangan setelah fertilisasi. Efisiensi kematangan sitoplasma termasuk kemampuan oosit untuk menghambat penetrasi sperma lebih dari satu dan juga mendukung dekondensasi kepala sperma pada ooplasma saat oosit terfertilisasi. Kematangan inti dapat dievaluasi dengan pewarnaan sederhana seperti *aceto orcein* sedangkan pematangan sitoplasma dapat diketahui secara tidak langsung antara lain dari jumlah blastosis yang dihasilkan, kandungan glutatation pada oosit dan persentase pembentukan pronukleus jantan (Kidson 2005).

Proses pematangan oosit *in vivo* dapat ditiru secara *in vitro* dengan menggunakan medium dan keadaan yang meniru kondisi *in vivo*. Sistem kultur *in*

ibatkan beberapa faktor seperti sumber gas CO<sub>2</sub>, medium sebagai nutrisi, (wadah) dan suhu. Medium yang digunakan dalam pematangan oosit



dapat memberikan pengaruh bukan hanya pada oosit tapi juga terhadap perkembangan embrio. Dalam kultur pematangan oosit *in vitro* selain faktor medium, kualitas folikel dan oosit juga mempengaruhi tingkat pematangan oosit *in vitro*. Keberadaan sel kumulus yang mengelilingi oosit berperan penting untuk mendukung proses pematangan oosit secara *in vitro*.

Terdapat korelasi positif dari keberadaan lapisan sel granulosa pada kumulus dan kemampuan perkembangan embrio (Cobo *et al.* 1999) karena fungsi sel kumulus menyediakan nutrisi untuk oosit selama perkembangan folikel. Gonadotrophin berperan untuk menstimuli proses meiosis pada oosit mamalia dan ekspansi sel kumulus. Ekspansi sel kumulus merupakan salah satu indikator keberhasilan pematangan oosit secara *in vitro* dan menjadi kriteria pemilihan oosit yang akan digunakan dalam proses fertilisasi *in vitro*.

### **Fertilisasi *In Vitro***

Fertilisasi merupakan proses yang penting dalam kehidupan makhluk hidup. Proses fertilisasi menandakan dimulainya kehidupan organisme baru dengan terjadinya penggabungan informasi genetik jantan dan betina melalui peleburan sperma dan oosit. Proses fertilisasi bukan hanya peristiwa penggabungan informasi genetik jantan dan betina saja, akan tetapi dalam proses ini melibatkan banyak hal yang sangat kompleks.

Proses fertilisasi ini hanya dapat terjadi setelah didahului proses kapasitasasi spermatozoa (Gordon, 2003) dan maturasi oosit. Pada saat fertilisasi *in vitro* dan

perkembangan embrio, sel kumulus memberikan pengaruh positif terhadap terjadinya oosit (Nandi *et al.*, 1998). Oosit memiliki kondisi lapisan sel-



sel kumulus yang berbeda-beda untuk masing-masing oosit. Sel-sel kumulus mampu meningkatkan area kontak antarspermatozoa dan oosit (Cox et al., 1993) dan dengan memilih sub populasi sperma yang mampu berinteraksi dengan oosit (Gasparrini, 2002). Untuk dapat memfertilisasi oosit, spermatozoa terkapasitasi harus melewati sel-sel kumulus, menembus zona pelucida dan berfusi dengan oosit. Oosit dengan sel-sel kumulus sedikit bisa dilewati spermatozoa dalam waktu singkat, sementara oosit dengan sel-sel kumulus lebih banyak akan dilewati oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama untuk mencapai zona pelucida (Parera et al., 2014).

### **Perkembangan Embrio *In Vitro***

Oosit yang dihasilkan melalui proses pematangan dan fertilisasi *in vitro* telah berhasil dikembangkan secara *in vitro* menjadi embrio di dalam medium kultur seperti KSOM (Liu et al. 2001), TCM-199 (Laurincik et al. 1994), CR1aa (Yulnawati 2006), synthetic oviduct fluid (SOF) (Krisher et al. 1999) atau medium dengan komposisi bahan kimia tertentu (chemically defined medium) (Erbach et al. 1994, Yoshioka et al. 2002) dan lain sebagainya. Metode kultur embrio secara *in vitro* sangat mempengaruhi keberhasilan perkembangan embrio lebih lanjut dan proses implantasi pada resipien (Petters 1992). Hambatan dalam produksi embrio secara *in vitro* adalah terjadinya fenomena cell block pada pertumbuhan embrio. Hambatan ini sering terjadi pada tahap awal perkembangan embrio atau tahap embrio preimplantasi. Pada embrio tikus dan mencit, hambatan

terjadi pada tahap dua sel sedangkan embrio sapi dan domba  
ini hambatan perkembangan pada tahap delapan sel.



Usaha yang telah dilakukan untuk mengatasi hambatan perkembangan pada embrio antara lain penggunaan sistem ko-kultur dengan sel-sel somatis seperti monolayer sel-sel kumulus (Malekshah & Moghaddam 2005), sel-sel epitel tuba Falopii (Hendri 1997) atau penggunaan chemically defined medium yang diberi tambahan asam amino (Booth et al. 2005) dan bahan-bahan development factor tertentu. Menurut Gordon (1994) terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan perkembangan embrio in vitro seperti jenis medium yang digunakan, penambahan serum, substrat energi, sistem inkubasi (suhu, fase gas, pH, osmolalitas medium, kualitas air), penggunaan ko-kultur sel epitel tuba Falopii dan sel kumulus.

Perkembangan tahap awal embrio tergantung pada lingkungan mikro pematangan oosit (Kidson 2005). Ketika proses pematangan oosit in vitro tidak memberikan lingkungan yang cocok bagi oosit, walaupun dapat terbentuk kematangan inti dan terjadi fertilisasi setelah IVF namun hasil akhir adalah rendahnya nilai kualitas blastosis/embrio yang dihasilkan (Lucidi, 2003). Tidak cukup proses pematangan sitoplasma pada oosit akan mempengaruhi perpindahan atau pertukaran kontrol perkembangan maternal ke embrio dan menghasilkan perkembangan yang salah (Vassena et al. 2003). Menurut Laurincik et al. (2000) tahap pembelahan 1-3 sel tergantung pada maternal genom dan lebih dari 3 sel akan tergantung pada embrionik genom, tahapan ini merupakan keadaan yang sangat kritis karena terjadi transisi maternal-embrionik genom.



## **Insulin-Transferin-Selenium (ITS)**

Suplementasi *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) diketahui dapat digunakan sebagai antioksidan karena mampu mengurangi tingkat ROS dalam sel (Das *et al*, 2013). *Insulin Transferrin Selenium* (ITS) sebagai suplemen media yang kompleks yang terdiri dari senyawa insulin, transferin, dan selenium yang telah dijual secara komersial (Liu *et al*, 2013). *Insulin transferrin selenium* merupakan protein kompleks yang dapat memacu perkembangan sel, mencegah kerusakan sel karena antioksidan di dalamnya sehingga dapat mempertahankan viabilitas embrio.

Tiga komponen yang dimiliki ITS adalah Insulin, Transferrin dan Selenium yang bekerja bersama dalam perbaikan sel dan saling berkaitan (Kurzawa *et al*, 2002). Transferrin dan Selenium, yang terkandung dalam ITS, membantu dalam pertumbuhan sel menjadi lebih baik karena Transferrin berperan sebagai protein transport zat besi ke dalam sel serta dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel melalui proses detoksifikasi terhadap peroksidase dan radikal bebas dalam medium (Djuwita *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013).

## **Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Perkembangan Embrio Secara *In Vitro***

Proses perkembangan embrio secara sapi Bali secara *in vitro* dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya:

### **A. *Reactive Oxygen Species* (ROS)**

Radikal bebas adalah senyawa kimia yang pada orbit terluarnya memiliki satu atau lebih electron yang tidak berpasangan yang membuatnya



menjadi tidak stabil dan sangat reaktif sehingga akan cenderung bereaksi dengan senyawa kimia lain yang ada di dalam tubuh. Radikal bebas yang ada di dalam tubuh dapat berasal dan dihasilkan secara endogen sebagai respon normal normal dari rantai reaksi respirasi di dalam tubuh. Salah satunya yaitu *Reactive Oxygen Species*. (Abhisek, 2007)

*Reactive Oxygen Species* merupakan jenis molekul dan radikal bebas yang berasal dari molekul Oksigen ( $O_2$ ) yang digunakan dalam pernapasan. Pada kondisi normal, molekul oksigen mengandung dua electron tidak berpasangan pada orbit orbit terluarnya. Jika salah satu dari kedua electron tidak berpasangan tereksitasi dan kecepatan spinnya berubah, maka akan terbentuk zat radikal yang dinamakan singlet oksigen, bersifat radikal, dan oksigen berubah menjadi oksidan. Keberadaan ROS ini dalam jumlah berlebihan akan menimbulkan efek toksik bagi sel dengan melakukan pemotongan atau modifikasi pada basa DNA, inaktivasi enzim, arthritis, dan pembentukan radikal bebas lain seperti lipidik. (Nikolai, 2000)

Ketidakseimbangan radikal bebas ROS menyebabkan timbulnya stress oksidatif pada sel embrio. Stress oksidatif ini dapat disebabkan oleh kekurangan zat antioksidan dalam makanan atau meningkatnya kadar ROS dalam sel sebagai hasil sampingan selama proses metabolisme energi dalam sel. (Nikolai, 2000)

## B. Genetik

Baik-tidaknya perkembangan embrio juga dapat dipengaruhi karena faktor

yang diturunkan melalui gen resesif dan letal ataupun karena terjadi selama gametogenesis yang menyebabkan gangguan fertilitas sehingga



perkembangan embrio menjadi terhambat atau bahkan mati. Kematian embrio pada sapi sering terjadi karena perkawinan inbreeding atau perkawinan seapak atau seibu, sehingga sifat jelek yang dimiliki induk akan lebih sering muncul pada turunannya. (Khondik, 2009)

Sebelum implantasi, embrio lebih mudah terkena pengaruh mutasi genetik dan kelainan kromosom (chromosomal aberration) diikuti oleh kematian embrio. Kelainan kromosom dapat dibedakan atas kelainan jumlah kromosom dan struktur kromosom. Kejadian ini tetap berlangsung karena kegagalan penyebaran kromosom atau susunan kromatin dalam sel tubuh penderita yang terjadi selama berlangsungnya proses meiosis dan mitosis dari sel telur atau sel mani yang dapat menghasilkan 2 bentuk sel yang poliploid. Aneuploid adalah kelainan kromosom hewan yang dapat terjadi karena pengurangan jumlah kromosom yang normal ( $2n-1$ ), sedang poliploid adalah penambahan jumlah kromosom yang normal ( $2n+1$ ). Kelainan tersebut di atas dapat menyebabkan kematian embrio pada sapi. Bentuk kelainan kromosom yang menyebabkan kematian embrio ini dapat terjadi pada sapi usia kebuntingan 8-16 hari. (Khondik, 2009)

### C. Nutrisi

Pemenuhan kebutuhan kalori dan kurangnya nutrisi spesifik (lemak, vitamin E, selenium, zing, tembaga, mangaan) dalam media kultur akan mempengaruhi perkembangan embrio sapi Bali secara *in vitro*. Kebutuhan nutrisi seperti asam nukleat yang terpenuhi akan membantu perkembangan embrio pada tahap

DNA selama proses pembelahan sel. (Ramdhayana, 2005)



#### D. Suhu Lingkungan

Agar embrio mampu berkembang dengan baik dalam kondisi *in vitro*, suhu merupakan factor yang sangat penting untuk menunjang hal tersebut. Suhu incubator yang sesuai dengan suhu alami rahim mampu menunjang perkembangan embrio dengan cara menunjang pengaktifan enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme dalam sel. (Kim, 2007)

