

**KOMPETENSI PERKEMBANGAN OOSIT IMMATURE KAMBING DENGAN
DIAMETER BERBEDA DALAM MEDIUM TCM-199 YANG DISUPLEMENTASI
CAIRAN FOLIKEL**

TESIS

oleh

**ALI HARRIS
116090100011004**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**KOMPETENSI PERKEMBANGAN OOSIT IMMATURE KAMBING DENGAN
DIAMETER BERBEDA DALAM MEDIUM TCM-199 YANG DISUPLEMENTASI
CAIRAN FOLIKEL**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam bidang Biologi**

oleh

**ALI HARRIS
116090100011004**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
MINAT MOLEKULER REPRODKSI**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

KOMPETENSI PERKEMBANGAN OOSIT *IMMATURE KAMBING DENGAN DIAMETER BERBEDA DALAM MEDIUM TCM-199 YANG DISUPLEMENTASI CAIRAN FOLIKEL*

Disusun oleh

**ALI HARRIS
116090100011004**

Telah dipertahankan di depan Majelis Pengaji
pada tanggal 7 Februari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam bidang biologi

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Sri Rahayu, M.Kes.
19620528 198701 2 001**

**Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS.
19600512 198701 1 001**

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pascasarjana Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

**Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
19671213 199103 2 001**

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

KOMPETENSI PERKEMBANGAN OOSIT *IMMATURE KAMBING DENGAN DIAMETER BERBEDA DALAM MEDIUM TCM-199 YANG DISUPLEMENTASI CAIRAN FOLIKEL*

**Nama Mahasiswa : Ali Harris
NIM : 116090100011004
Program Studi : Biologi Reproduksi
Minat : Biologi Molekuler Reproduksi**

KOMISI PEMBIMBING

**Ketua : Dr. Sri Rahayu, M.Kes.
Anggota : Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS.**

TIM DOSEN PENGUJI

**Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS.
Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Sri Wahyuningsih, M.Si.**

Tanggal Ujian : 7 Februari 2014

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pegetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Februari 2014



Nama : ALI HARRIS
NIM :116090100011004

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada hari sabtu tanggal 7 Januari 1989 dari Ibu bernama Nurhasanah dan ayah Zainuddin. Penulis merupakan anak ketiga dari empat bersaudara yang dibesarkan di Selong, Kabupaten Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat.

Penulis masuk sekolah dasar pada tahun 1995 di Sekolah Dasar Negeri 4 Selong dan lulus pada tahun 2001, kemudian melanjutkan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Selong dan lulus pada tahun 2004. Tahun 2007 penulis selesai menempuh sekolah menengah atas di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Selong dan pada tahun yang sama penulis diterima di Program Studi Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mataram melalui Penerimaan Mahasiswa Jalur Khusus (PMJK).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif di kegiatan keorganisasian kampus dan sempat diberikan amanah untuk menjabat sebagai wakil ketua himpunan mahasiswa biologi pada periode tahun 2008-2009 dan menjabat sebagai ketua pada periode tahun 2009-2010. Selama menjadi mahasiswa penulis juga aktif dalam kegiatan-kegiatan ilmiah seperti penelitian bersama dalam lingkungan kampus dan mengikuti pekan ilmiah nasional.

Setelah lulus dari jenjang S-1 pada tahun 2011, penulis berkesempatan melanjutkan studi Program Pasacasarjana Biologi pada tahun 2012 di Universitas Brawijaya Malang. Pada Program Pascasarjana tersebut, penulis mengambil bidang spesifikasi biologi reproduksi molekuler dan menyelesaikan studi pada tahun 2014.

Malang, Februari 2014

Penulis

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RINGKASAN

KOMPETENSI PERKEMBANGAN OOSIT *IMMATURE* KAMBING DENGAN DIAMETER BERBEDA DALAM MEDIUM TCM 199 YANG DISUPLEMENTASI CAIRAN FOLIKEL

Ali Harris¹, Sri Rahayu¹, Gatot Ciptadi².

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

²Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.

2014

In Vitro Maturation (IVM) merupakan proses pematangan oosit *immature* sampai mencapai metafase II yang dipengaruhi oleh kualitas oosit dan medium yang digunakan. Selama ini kriteria seleksi oosit didasarkan pada jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilingi oosit, tanpa memperhatikan diameter oosit. Selama proses folikulogenesis dan oogenesis, terjadi perubahan diameter oosit sebagai akibat perubahan dari fisiologi sitoplasma dan nukleus. Perubahan kondisi fisiologi ini disebabkan karena adanya sintesis protein, peningkatan jumlah organel, adanya akumulasi air, ion, karbohidrat dan lipid yang dibutuhkan oosit untuk mencapai kompetensi perkembangan pada proses meiosis. Salah satu bahan yang digunakan sebagai suplementasi medium IVM adalah cairan folikel. Cairan folikel mengandung *peptide growth factor*, dan hormon (FSH dan LH) yang berperan menstimulasi maturasi oosit. Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengetahui pengaruh diameter oosit *immature* terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit, dan (2) mengetahui pengaruh suplementasi cairan folikel pada medium terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit. Ovarium kambing yang digunakan diperoleh dari Rumah Potong Hewan Sukun, Kota Malang. Oosit diperoleh melalui aspirasi folikel (2-7 mm) menggunakan syringe 10 ml dan needle 18 G. Oosit *immature* dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok 1 (<160.5 μ m), kelompok 2 (160.5-170 μ m), dan kelompok 3 (>170 μ m). Penelitian menggunakan 3 jenis medium yaitu TCM-199 + 10% FBS (medium 1), TCM-199 + 10% cairan folikel (medium 2) dan TCM-199 + 15% cairan folikel (medium 3). Oosit dimaturasi selama 26 jam pada 39°C dan 5% CO₂. Pengamatan kompetensi perkembangan *immature* oosit meliputi tingkat ekspansi sel kumulus dan tingkat maturasi inti (GV, GVBD, MI, dan MII). Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* yang dikultur pada 3 medium berpengaruh nyata terhadap ekspansi kumulus tingkat 1 dan metafase II dengan nilai signifikansi 95% ($p<0.05$). Persentase ekspansi kumulus tingkat 1 pada kelompok diameter 1, kelompok 2, dan kelompok 3 secara berturut-turut adalah, pada medium 1 yaitu 54.41%, 72.2%, dan 64.1%; medium 2 yaitu 44.44%, 63.8%, dan 73.9%; dan medium 3 yaitu 48.2%, 67.4%, dan 83.1%. Persentase maturasi inti pada metafase II pada kelompok diameter 1, 2 dan 3 secara berturut-turut adalah, pada medium 1 yaitu 29.7%, 50.7%, dan 70%; medium 2 yaitu 29.1%, 56.6%, dan 68.5%; dan medium 3 yaitu 33.3%, 53.5%, dan 76.2%. Kompetensi perkembangan oosit (ekspansi kumulus dan maturasi inti) pada ketiga medium tidak berbeda nyata ($p>0.05$). Kesimpulan penelitian ini adalah, 1) diameter *immature* oosit berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit, 2) cairan folikel dapat digunakan sebagai suplementasi medium kultur *in vitro*.

SUMMARY

DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF GOAT IMMATURE OOCYTE WITH DIFFERENCE DIAMETERS IN TCM-199 MEDIUM SUPPLEMENTATION WITH FOLIKULAR FLUID

Ali Harris¹, Sri Rahayu¹, Gatot Ciptadi².

¹Biology Department, Faculty Mathematic and Natural Science, Brawijaya University

²Faculty of Animal Husbandry, Brawijaya University.

2014

In Vitro Maturation (IVM) is a process of maturation of immature oocytes to reach metaphase II, which is influenced by the quality of the oocyte and the medium used. During this time, the oocyte selection criteria based on the number of layers of cumulus cells surrounding the oocyte, without regard to diameter of the oocyte. During the process of folliculogenesis and oogenesis, oocyte diameter changes as a result of physiological changes in the cytoplasm and nucleus. Changes in physiological conditions is due to the presence of protein synthesis, an increase in the number of organelles, the accumulation of water, ions, carbohydrates and lipids are needed to reach the oocyte developmental competence in the process of meiosis. One of the materials used as supplementation of IVM medium is follicular fluid. Follicular fluid containing peptide growth factors, and hormones (FSH and LH), which acts to stimulate oocyte maturation. This study aims to (1) determine the effect of the diameter of immature oocyte to the developmental competence of oocyte maturation, and (2) determine the effect of follicular fluid supplementation in IVM medium to the developmental competence of oocyte maturation. Ovaries goats used in this study were obtained from Slaughterhouse Sukun, Malang. Oocytes obtained by aspiration of antral follicles (2-7 mm) using a 10 ml syringe and needle 18 G. Immature oocytes were divided into 3 groups: group 1 (<160.5 µm), group 2 (160.5-170 µm), and group 3 (> 170 µm). The study uses three types of medium that TCM-199 + 10% FBS (medium 1), TCM-199 + 10% follicular fluid (medium 2) and TCM-199 + 15% follicular fluid (medium 3). Oocytes matured for 26 hours at 39°C and 5% CO₂. Observations developmental competence of immature oocyte includes level cumulus cell expansion and maturation level of nuclei (GV, GVBD, MI and MII). The results showed that the diameter of the immature oocytes were cultured in 3 medium significantly affect to the cumulus expansion levels 1 and metaphase II with a significance value of 95% ($P < 0.05$). The percentage of cumulus expansion rate 1 in diameter group 1, 2, and 3 respectively are, in medium 1 is 54.41%, 72.2%, and 64.1%; in medium 2 is 44.44%, 63.8%, and 73.9%; and for medium 3 is 48.2%, 67.4%, and 83.1%. The percentage of nuclear maturation in metaphase II in diameter group 1, 2 and 3 respectively are, in medium 1 is 29.7%, 50.7%, and 70%; in medium 2 is 29.1%, 56.6%, and 68.5%; and for medium 3 is 33.3%, 53.5%, and 76.2%. Comparison of developmental competence of oocytes in medium 1, 2 and 3 are not significantly different ($P > 0.05$). The conclusion of this study is, 1) the diameter of immature oocytes affects to oocyte developmental competence, 2) follicular fluid can be used as a medium supplementation in the in vitro culture.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kepada Allah SWT, karena atas berkah dan ridhaNya sehingga tesis berjudul “Kompetensi pekembangan oosit *immature* dengan diameter berbeda dalam medium TCM-199 yang disuplementasi cairan folikel” dapat terselesaikan. Shalawat dan salam tak lupa kami haturkan kepada junjungan alam Nabi besar Muhammad SAW yang telah membawa manusia dari alam kebodohan menuju dunia ilmu pengetahuan yang lebih baik. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tesis ini. Atas dasar tersebut, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Rahayu, M.Kes., selaku ketua komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan akademis, bantuan jurnal, semangat dan dukungan dalam menyelesaikan penelitian, saran-saran selama perbaikan dan penyelesaian tesis serta nasehat-nasehat yang bermanfaat bagi penulis;
2. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., selaku anggota komisi pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan teknis, keterampilan, fasilitas materi penelitian, bantuan moril dan materil, pemecahan masalah penelitian, memberikan semangat dan dorongan untuk menyelesaikan penelitian;
3. Dr. Ir. Moch. Sasmoto Djati, MS., selaku dosen penguji proposal tesis, yang telah memberikan masukan saran mengenai teknis dalam penelitian, berbagi pengalaman, dan memberikan dorongan untuk perbaikan tesis;
4. Dr. Ir. Sri Wahyuningsih, M.Si., selaku dosen penguji proposal tesis yang telah memberikan saran, semangat dan dorongan untuk perbaikan tesis;
5. Ayahanda Zainuddin dan Ibunda Nurhasanah yang telah merawat dan membesarkan penulis dengan penuh kasih sayang, yang tidak lelah memberikan doa, dorongan motivasi dan bantuan materil, kepada mereka karya sederhana ini penulis persembahkan.
6. Kakak Saifurruhaidi, Kakak Salamah Nirawati, Kakak Ardia Arini, dan Adik Ali Surya Ningrat yang telah memberikan bantuan moril dan materil, memberikan kasih sayang dan memberikan semangat dan doa selama penulis bersekolah.
7. Dra. Tri Ardyati, M.Agr.,Ph.D. dan staf Pascasarjana Biologi yang telah memberikan bantuan selama penulis menempuh pendidikan magister.
8. Analis LSIH, Helly Nurul Karima, S.Pt, MP., Setiawati, S.Si., yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian.
9. Ayu Raisa K.N. M.Si, Hellen A.P. M.Si, Dewi S. M.Si, Fitria W.L. M.Si, Avivi I. S.Si, Munawir S. S.Pd, Abdul B. M.Pd, Prasetyo S.Si, atas bantuan, diskusi, semangat dan kebersamaan selama penulis menempuh pendidikan magister.
10. Semua pihak dan sahabat-sahabat pascasarjana biologi yang telah membantu penulis.

Akhirnya, semoga tulisan ini bermanfaat dan diridhai Allah SWT.

Malang, Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN TESIS.....	ii
SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
RIWAYAT HIDUP	v
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	vi
RINGKASAN.....	vii
<i>SUMMARY</i>	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xv
 BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Ovarium	5
2.2. Folikulogenesis.....	7
2.3. Oogenesis	9
2.4. Diameter Oosit	10
2.5. Cairan Folikel	12
2.6. Maturasi Oosit secara In Vitro	12
2.7. Faktor yang Mempengaruhi Pematangan Oosit	13
2.8. Kerangka Konseptual Penelitian	15
2.9. Hipotesis Penelitian	16
 BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.2. Kerangka Operasional Penelitian	18
3.3. Bahan dan Alat Penelitian.....	19
3.3.1. Bahan	19
3.3.2. Alat	19
3.4. Tahapan Penelitian.....	19
3.4.1. Pengambilan Ovarium	19

3.4.2. Eksplorasi Ukuran Diameter Oosit <i>Immature</i>	20
3.4.3. Pengumpulan Cairan Folikel.....	21
3.4.4. Persiapan Media IVM.....	21
3.4.5. Koleksi Oosit.....	21
3.4.6. Maturasi Oosit secara <i>In Vitro</i>	23
3.4.7. Pengamatan Kompetensi Perkembangan Maturasi Oosit	23
3.5. Desain Penelitian	24
3.6. Analisis Data	24
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Eksplorasi ukuran diameter oosit <i>immature</i>	25
4.2. Hubungan diameter oosit <i>immature</i> terhadap kualitas sel kumulus	27
4.3. Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap kompetensi maturasi oosit	30
4.4. Pengaruh jenis medium terhadap kompetensi maturasi oosit	41
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	44
5.2. Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
4.1.	Hasil eksplorasi ukuran diameter oosit <i>immature</i>	25
4.2.	Hubungan diameter oosit <i>immature</i> terhadap kualitas sel kumulus	28
4.3.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS).....	30
4.4.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan folikel).....	32
4.5.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan folikel).....	33
4.6.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS).....	36
4.7.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel).....	37
4.8.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel).....	39
4.9.	Pengaruh jenis medium terhadap tingkat ekspansi kumulus	41
4.10.	Pengaruh jenis medium terhadap tingkat maturasi inti	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
2.1.	Ovarium Kambing	5
2.2.	Potongan Melintang Ovarium	6
2.3.	Siklus Folikulogenesis	7
2.4.	Pertumbuhan dan Perkembangan Oosit	10
2.5.	Pengukuran Oosit beserta Zona Pellusida	11
2.6.	Kerangka Konseptual Penelitian	17
3.1.	Kerangka Operasional Penelitian	18
3.2.	Cara Pengukuran Diameter Oosit <i>Immature</i>	20
3.3.	Pembagian Oosit <i>Immature</i> Kambing berdasarkan Kriteria Sel Kumulus	22
4.1.	Hasil Eksplorasi Ukuran Diameter Oosit <i>Immature</i>	25
4.2.	Oosit <i>Immature</i> berdasarkan Kelompok Diameter	26
4.3.	Hubungan Diameter Oosit <i>Immature</i> terhadap Kualitas Sel Kumulus	28
4.4.	Kualitas Sel Kumulus pada Oosit <i>Immature</i>	29
4.5.	Tingkat ekspansi sel kumulus dan polar bodi I setalah kultur 26 jam	31
4.6.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel), medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel)	32
4.7.	Pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel), medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel)	37
4.8.	Maturasi inti dengan pewarnaan aceto orcein 1%	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Halaman
1.	Pembuatan larutan NaCl.....	54
2.	Sterilisasi alat.....	55
3.	Pembuatan aceto orcein 1% (staining).....	56
4.	Pembuatan aceto glycerin (destaining)	57
5.	Analisis ANOVA hubungan diameter oosit <i>immature</i> terhadap kualitas sel kumulus	58
6.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS)	60
7.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel).....	62
8.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel).....	64
9.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS).....	66
10.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan folikel)	68
11.	Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit <i>immature</i> terhadap tingkat maturasi inti pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan folikel)	70
12.	Analisis ANOVA pengaruh jenis medium terhadap kompetensi perkembangan oosit <i>immature</i> (ekspansi kumulus dan maturasi inti).....	72

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	: analysis of varians
DI	: deionized water
FBS	: fetal bovine serum
FCS	: fetal calf serum
FSH	: follicle stimulating hormone
GV	: germinal vesicle
GVBD	: germinal vesicle break down
IVP	: in vitro production
IVM	: in vitro maturation
IVF	: in vitro fertilization
IVC	: in vitro culture
LH	: luteinizing hormone
M-I	: metaphase I
M-II	: metapase II
NaCl	: natrium cloride
PBS	: phosphat buffer saline
pH	: poison of hydrogen
RAK	: rancangan acak kelompok
RPH	: rumah potong hewan
rpm	: rotary per minutes

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama Unit</u>
%	: persen
<	: lebih kecil dari
>	: lebih besar dari
±	: standar deviasi
°C	: derajat Celcius
µm	: mikrometer
g	: gram
ml	: mili liter

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berkembangnya bioteknologi reproduksi dalam pengembangan produksi hewan menyumbang kemajuan dalam teknologi produksi kambing, salah satunya adalah *in vitro embryo production* (IVP). IVP meliputi tiga proses yaitu *in vitro maturation* (IVM), *in vitro fertilization* (IVF), dan *in vitro culture* (IVC). IVP merupakan *assisted reproduction* (Khatun *et al.*, 2010), yang memungkinkan hewan bereproduksi lebih dari kapasitasnya. IVP dimanfaatkan juga dalam mempelajari infertilitas, *embryo biotechnology*, memahami regulasi *metabolic pathway* perkembangan awal embrio dan membantu dalam memahami proses biologi pada kontrol dan mekanisme maturasi oosit (Khatun *et al.*, 2010; Paramio, 2010). Pada proses IVP diketahui bahwa IVM memegang peranan penting untuk keberhasilan IVP (Wang *et al.*, 2007; Wattimena, 2011).

In vitro maturation merupakan proses pematangan oosit *immature* pada medium yang diperkaya hormon, protein dan *growth factor* sampai mencapai metafase II (M-II) yang ditunjukkan dengan ekspansi sel kumulus atau keberadaan polar bodi pertama (PB-I). Komponen utama yang dibutuhkan dalam keberhasilan IVM adalah oosit *immature* dengan kualitas seragam dan medium kultur yang dapat mendukung perkembangan oosit *immature* (Gustari *et al.*, 2009). Sementara itu, oosit *immature* yang diperoleh dari aspirasi folikel antral diketahui memiliki kualitas yang beragam, sehingga untuk mendapatkan oosit *immature* perlu dilakukan seleksi.

Secara umum, kriteria seleksi oosit yang selama ini digunakan berdasarkan jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilingi oosit (Pujol *et al.*, 2004; Heleil dan Fayed, 2010). Hal tersebut didasarkan karena sel kumulus berperan dalam menjaga *gap junction* antara oosit dengan lingkungan luar oosit dan berperan sebagai mediator penyedia nutrisi. Namun seleksi oosit berdasarkan kriteria sel kumulus masih kurang maksimal. Menurut Lucas *et al* (2002) dan Agus dan Supriatna (2010), bahwa penggunaan kriteria sel kumulus bersifat subjektif sehingga masih diperoleh oosit berkualitas beragam. Penelitian Day *et al* (1996) pada babi menunjukkan hanya sekitar 20-30% oosit yang berkembang sampai tahap blastosit dari oosit dengan sel kumulus lengkap dan kompak. Keadaan tersebut diduga karena adanya keragaman kondisi fisiologis sitoplasma dan nukleus pada oosit hasil aspirasi yang ditunjukkan dengan perbedaan diameter yang dimiliki (Lucas *et al.*, 2002). Berdasarkan hal tersebut, pemilihan oosit untuk keperluan maturasi *in vitro* perlu

mempertimbangkan ukuran diameter oosit *immature* yang digunakan (Arlotto *et al.*, 1996; Roca *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 2002).

Menurut Ledda *et al* (1999), kemampuan oosit untuk memasuki proses meiosis dan mencapai metaphase II ditentukan oleh diameter oosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya pada ukuran tertentu oosit memiliki kemampuan untuk berkembang setelah diproses secara *in vitro* (Otoi *et al.*, 1997; Hyttel *et al.*, 1997; Amstrong, 2001; Pujol *et al.*, 2004). Selama proses folikulogenesis dan oogenesis, oosit mengalami pertambahan diameter sebagai akibat dari perubahan fisiologi sitoplasma dan nukleus. Perubahan kondisi fisiologi ini meliputi sintesis protein, penyebaran organel, meningkatnya jumlah retikulum endoplasma, ribosom, dan mitokondria (Hyttel *et al.*, 1997; Kastrop *et al.*, 1990). Pertambahan ukuran diameter oosit *immature* disebabkan juga akibat adanya akumulasi air, ion, karbohidrat dan lipid (Fair *et al.*, 1997). Perubahan kondisi fisiologi intraseluler ini dibutuhkan oleh oosit untuk mendapatkan kompetensi perkembangan pada proses meiosis yaitu dari proses *germinal vesicle* (GV) menuju metaphase II (M-II) (Evecen *et al.*, 2010; Ledda *et al.*, 1999; Hyttel *et al.*, 1997) dan berperan pada tahapan selanjutnya setelah maturasi oosit (Johnson dan Everitt, 2007). Lechniak *et al* (2002) dan Ledda *et al* (1999) menyatakan bahwa diameter oosit *immature* berkorelasi positif terhadap kemampuan oosit untuk mencapai M-II pada kondisi *in vitro*.

Pada domba, oosit dari folikel besar memiliki peluang yang lebih besar untuk mencapai metaphase II (Lonergan *et al.*, 1994; Cognie *et al*, 1998). Pada babi diketahui terdapat hubungan antara diameter oosit dengan kemampuan perkembangan (Lucas *et al.*,2002). Pada sapi (Lonergan *et al.*, 1994; Lequarre *et al.*,2005) dan unta (Khatir *et al.*, 2007) diketahui terdapat pengaruh diameter terhadap kemampuan perkembangan oosit. Raghu *et al* (2002) menunjukkan bahwa oosit berdiameter besar memberikan pengaruh baik pada perkembangan oosit secara *in vitro*. Hasil ini menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* dapat digunakan dalam menunjang kriteria sel kumulus pada proses seleksi oosit.

Selain kualitas oosit, penggunaan medium yang tepat juga merupakan salah satu komponen yang menentukan dalam keberhasilan maturasi *in vitro*. Medium yang digunakan dibuat semirip mungkin dengan kondisi *in vivo* untuk menunjang perkembangan oosit sampai tahap M-II (Haque *et al.*, 2011). TCM-199 diketahui merupakan medium standar dalam maturasi *in vitro* dan umumnya diberikan tambahan serum, protein, dan hormon (FSH dan LH) (Rodrigues dan Rodrigues, 2003; McNatty *et al.*, 2007). Selama ini suplementasi hormon dan serum yang umum digunakan dalam medium maturasi *in vitro* berasal dari industri farmasi, seperti fetal bovine serume (FBS) (Wani *et al.*, 2000; Nava

dan Tajik, 2000), bovine serum albumin (BSA) dan fetal calf serum (FCS) (Rho *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007) dengan harga yang relatif mahal dan pada daerah tertentu sulit didapat (Wattimena, 2011). Hal ini mendorong dibutuhkannya bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai suplementasi medium maturasi *in vitro*. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai bahan suplementasi medium maturasi *in vitro* adalah cairan folikel.

Cairan folikel merupakan cairan yang terakumulasi dalam rongga folikel yang memainkan peranan penting dalam folikulogenesis, maturasi oosit, menutrisi sel granulosa, luteinisasi dan ovulasi (Aqilar *et al.*, 2001). Cairan folikel diketahui mengandung bahan yang dapat menstimulasi maturasi oosit (Malekshah dan Moghaddam 2005). Diketahui bahwa cairan folikel mengandung *peptide growth factor* yang dipercaya berperan sebagai kunci dalam perkembangan oosit secara *in vivo* mencapai maturasi inti (Knight *et al.*, 1996; Nicolas *et al.*, 2005; Wahjuningsih dan Djati, 2012). Menurut Avery *et al* (2003) dan Khatir *et al* (1997) bahwa cairan folikel mengandung *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP), FSH, LH, dan beberapa nutrien yang berperan dalam *inhibitory factor*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Wahjuningsih dan Djati (2012), dalam cairan folikel ditemukan juga protein ERK2 dan protein p90rsk. Protein ERK2 merupakan protein kelompok *mitogen-activated protein kinase* yang berperan dalam penting dalam proses pengontrolan meiosis. Sementara itu, protein p90rsk merupakan protein dengan berat 90-kDa yang berperan dalam proses maturasi oosit Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa cairan folikel sukses sebagai suplementasi medium dalam maturasi *in vitro* pada babi (Isobe dan Terada, 2001) dan sapi (Nandi *et al.*, 2004).

Berdasarkan pada paparan latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian yang berjudul “kompetensi perkembangan oosit *immature* kambing dengan diameter berbeda dalam medium TCM-199 yang disuplementasi cairan folikel”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh diameter oosit *immature* terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit?
2. Bagaimana pengaruh suplementasi cairan folikel pada medium terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah diatas, tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh diameter oosit *immature* terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit.
2. Mengetahui pengaruh suplementasi cairan folikel pada medium terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Ilmiah

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan dan melengkapi informasi ilmiah terkait pengaruh cairan folikel dan diameter oosit terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit secara *in vitro*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Konsentrasi cairan folikel dan ukuran diameter oosit *immature* dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan rujukan dalam penggunaan dan pengembangan teknologi IVM untuk aplikasi bioteknologi reproduksi.

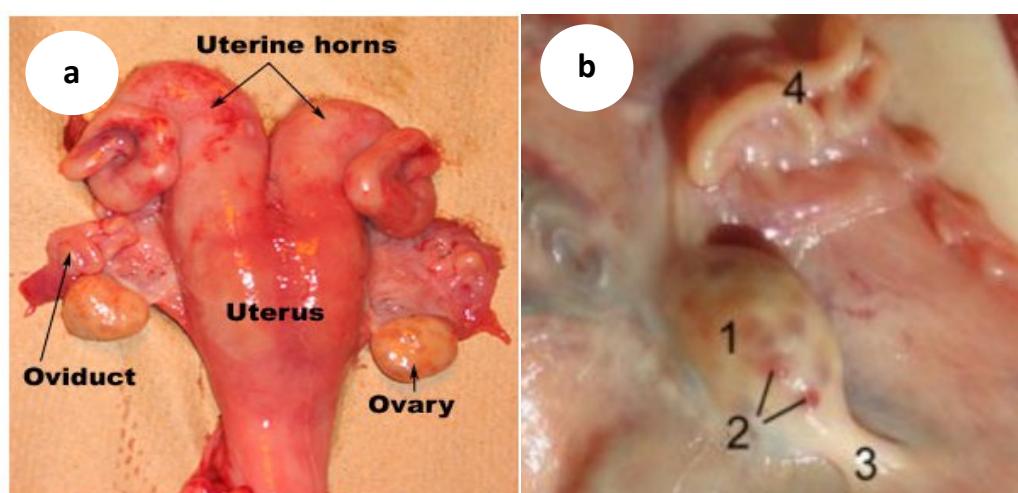
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ovarium

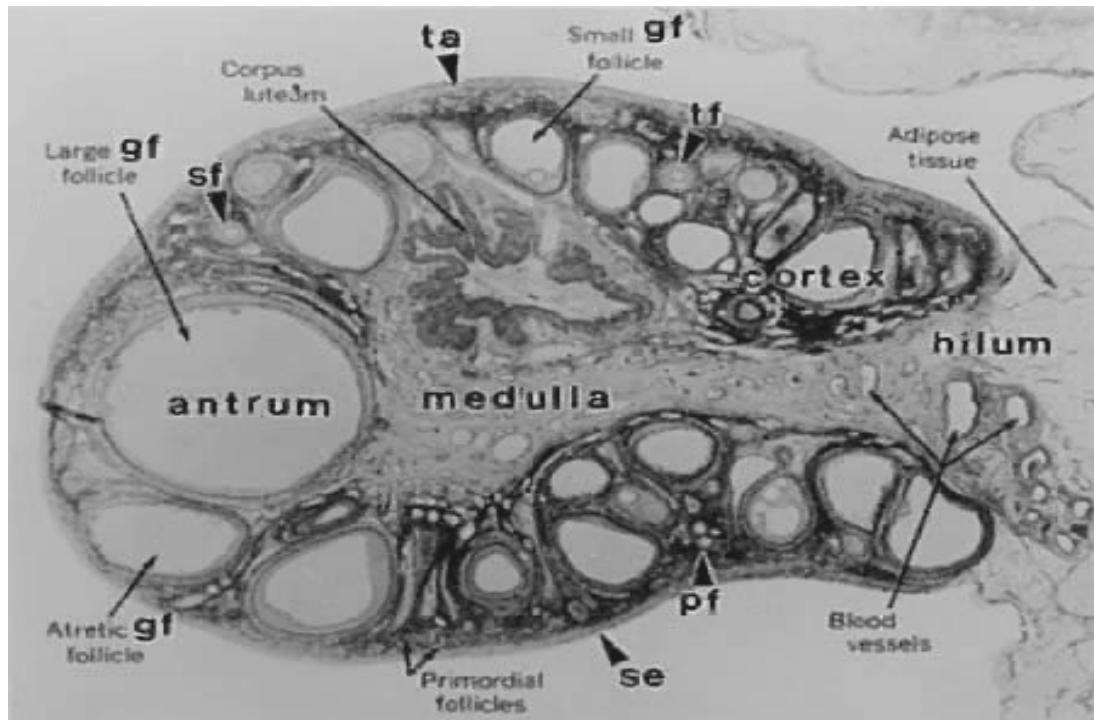
Ovarium merupakan organ reproduksi primer yang esensial pada hewan betina yang berjumlah sepasang dan terletak di kiri dan kanan uterus dalam rongga pelvis (Toelihere, 1985). Ovarium sebagai organ endokrin menghasilkan hormon estrogen dan progesterone dan sekaligus sebagai kelenjar eksokrin yang dapat menghasilkan oosit (Frandsen, 1992) dan mempengaruhi perkembangan ciri kelamin sekunder hewan betina (Hafez and Hafez, 2000). Ovarium memiliki bentuk oval (Gambar 2.1a) dan terletak di sebelah kaudal ginjal dan tergantung dalam rongga peritoneum yang terbungkus bursa ovarii dan menggantung pada ligamentum suspensorium yang disebut mesovarium (Frandsen, 1992).

Ovarium dibagi menjadi bagian tengah atau medulla dan lapisan tebal yang membungkus disebut korteks (Lindsay *et al*, 1982) (Gambar 2.2). Bagian medulla terdiri dari pembuluh darah, syaraf, jaringan ikat, dan banyak tenunan pengikat fibroblast. Pada bagian korteks terdiri atas *germinal epithelium*, folikel berbagai ukuran, korpus luteum, korpus albikan dan tenunan pengikat (Hafez and Hafez, 2000). *Germinal epithelium* menyelimuti permukaan ovarium dan merupakan asal dari folikel yang tumbuh dan berkembang (Hardjoprancjoto, 1995). Pada gambar 2.1 dapat dilihat ovarium pada kambing secara lengkap dengan organ reproduksi yang melengkapinya.



Gambar 2.1. Ovarium kambing

Keterangan: a) Organ kelamin betina pada kambing (Wildeus, 2000), b) Ovarium kambing, 1) Ovarium, 2) Folikel, 3) Ligamentum, 4) Tuba falopi (Motta dan Makobe, 1992).



Gambar 2.2. Potongan melintang ovarium

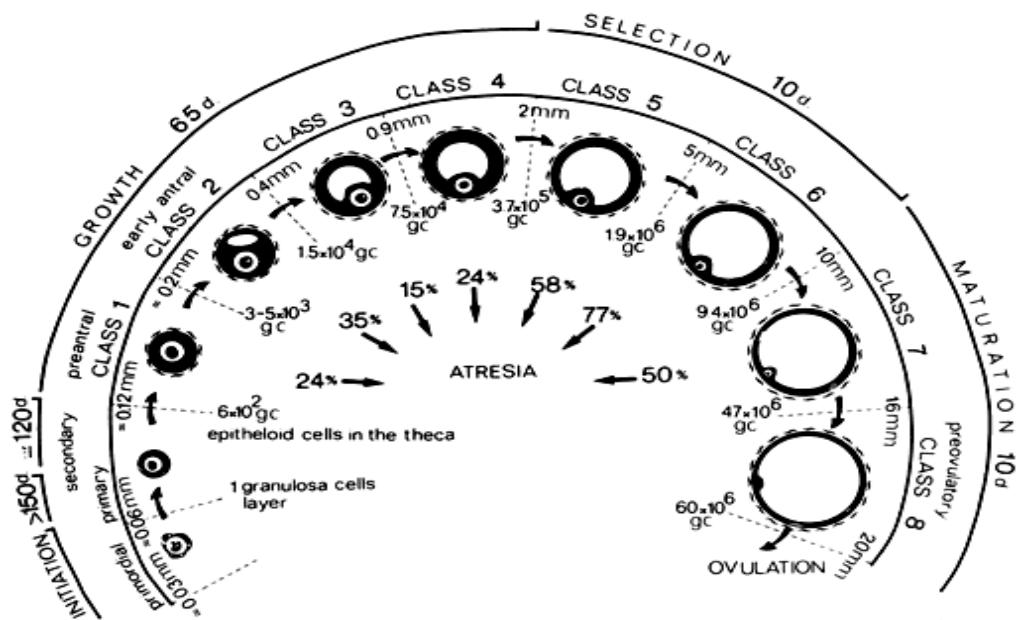
Keterangan: Gambar 2.2 menunjukkan bagian kortex yang terdiri dari folikel berbagai ukuran dan bagian medulla yang tersusun atas pembuluh darah dan saraf. Tanda panah pada gambar menunjukkan bagian-bagian ovarium yaitu, se) permukaan epitel, ta) tunica albuginea, pf) folikel primer, sf) folikel sekunder, tf) tersier folikel, gf) folikel graaf ukuran kecil, medium, dan besar (Erickson).

Ovarium dalam fungsinya sebagai organ reproduksi menghasilkan sel oosit. Struktur oosit terbentuk ketika selapis sel berkembang secara lengkap yang disebut folikel primer, kemudian menjadi folikel sekunder saat membelah menjadi beberapa lapisan. Perkembangan selanjutnya yaitu sekresi dan akumulasi cairan pada ruang antar sel dan secara perlahan kumpulan cairan ini membentuk rongga atau antrum yang terisi cairan folikel. Pembentukan antrum menandakan tercapainya stadium folikel terserier atau folikel *de Graaf* (Schatten dan Constantinecu, 2007).

Melalui kemajuan bioteknologi reproduksi, limbah rumah potong hewan berupa ovarium (osit) melalui suatu rekayasa bioteknologi dapat dimanfaatkan menjadi produk yang sangat berharga berupa embrio (Kaiin *et al.*, 2008). Hal tersebut dimungkinkan dengan penerapan teknologi fertilisasi *in vitro* (IVF) yang dilaksanakan melalui proses aspirasi dan maturasi oosit (Boediono dan Damayanti, 1996). Ovarium dari rumah potong hewan, dimanfaatkan juga dalam kultur preantral folikel (Ciptadi *et al.*, 2011), kriopreservasi ovarium (Rosadi *et al.*, 2011), dan sumber cairan folikel sebagai bahan alternatif suplementasi medium IVM (Wahjuningsih dan Djati, 2012).

2.2. Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan proses pertumbuhan dan perkembangan folikel yang terjadi di dalam ovarium yang dilihat dari ukurannya, jumlah lapisan sel granulosa, perkembangan sel teka interna dan eksterna, posisi oosit di kelilingi kumulus oophorus, dan peningkatan volume cairan rongga folikel (Hardjoprangoto, 1995). Proses pertumbuhan dan perkembangan folikel dikontrol oleh interaksi antara hormon gonadotropin (FSH dan LH) dan faktor regulasi di dalam ovarium (steroid, sitokin, dan faktor pertumbuhan). Hormon gonadotropin berperan dalam perkembangan folikel sampai mencapai folikel *degraaf* (Findlay *et al.*, 1996). Pada proses folikulogenesis, selain terjadi perkembangan inti, terjadi penambahan kandungan sitoplasma oosit dengan meningkatnya jumlah organel seperti retikulum endoplasma, ribosom, mitokondria, korteks granular dan akumulasi mRNA (Hyttel *et al.*, 1997).



Gambar 2.3 Siklus folikulogenesis

Folikulogenesis dapat dibagi menjadi dua fase. Fase yang pertama, disebut juga preantral atau fase gonadotropin-independen, ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi dari oosit. Fase yang kedua, disebut antral (*Graaf*) atau fase gonadotropin-independen, ditandai dengan peningkatan pesat dari ukuran folikel. Fase preantral dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan yang diproduksi secara lokal melalui mekanisme autokrin/parakrin. Fase yang kedua diatur oleh *Folikel Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) serta faktor-faktor pertumbuhan lainnya. (Anwar,

2005). Proses pertumbuhan folikel selama folikulogenesis tergantung bagaimana masing-masing folikel merespon hormon gonadotropin yang ada. Respon tersebut ditunjukkan dengan ketepatan reseptor oosit atau folikel dari sistem transduksi signal pro-reseptor, dalam hal ini reseptor yang dimaksud adalah sel granulosa dari folikel yang beperan dalam menyalurkan FSH pada oosit. Tanpa sel granulosa folikel akan mengalami degradasi (atresia) (Findlay *et al.*, 1996).

Berdasarkan perubahan morfologisnya, folikel diklasifikasikan menjadi 3 kelompok yaitu folikel primer, folikel sekunder dan folikel tersier (folikel *degraaf*). Folikel primer terdiri dari oosit yang dikelilingi oleh selapis sel epitel sedangkan sel teka belum terbentuk. Lapisan sel-sel yang mengelilingi folikel primer disebut *stratum granulosum* atau lapisan granulosa. Oosit berada pada satu sisi folikel dan dikelilingi sel granulosa yang disebut kumulus oophorus dan lapisan sel granulosa yang langsung menyelubungi oosit disebut korona radiata (Partodiharjo, 1992).

Folikel sekunder yang mengandung oosit yang letaknya eksentrik atau agak ke pinggir seperti pada folikel primer. Sel-sel granulosa terdiri dari 6-12 lapis sel. Oosit pada folikel sekunder sudah dilengkapi zona pelusida, dengan letak folikel yang bergerak menuju korteks (Yatim, 1990).

Stadium terakhir adalah folikel tersier, atau yang disebut folikel *degraaf*. Pada stadium ini, folikel akan membentuk antrum atau membentuk ruangan yang berisi cairan. Oosit tertutup rapat oleh masa yang padat yang terdiri dari sel granulosa yang membentuk kumulus oophorus dan menjulur ke antrum yang berisi cairan folikel. Cairan folikel tersebut kaya akan protein dan terdapat pula hormon estrogen yang diproduksi oleh sel teka interna dan teka eksterna. Kumulus oophorus menonjol kedalam antrum pada tempat yang berlawanan dengan folikel akan pecah dan terjadi ovulasi (Nalbandov, 1990).

Penggunaan folikel dalam pelaksanaan penelitian biasanya dibagi berdasarkan diameter, hal ini dikarenakan ukuran folikel berkaitan dengan ukuran oosit yang ada di dalamnya. Standar atau ukuran yang digunakan dalam pembagian folikel biasanya berbeda antara satu peneliti dengan peneliti yang lain. Lucas *et al.*, (2002) dalam penelitiannya mengelompokkan folikel berdasarkan diameternya menjadi lima kelompok yaitu kelompok 1 (0.40-0.99 mm), kelompok 2 (1.00-2.19 mm), kelompok 3 (2.20-2.79 mm), kelompok 4 (2.80-3.59 mm), dan kelompok 5 (3.60-6.50 mm) sedangkan Crozet *et al* (1995) membagi folikel menjadi tiga kelompok yaitu ukuran kecil (2-3 mm), folikel ukuran sedang (3.1-5 mm) dan folikel ukuran besar (>5 mm).

2.3. Oogenesis

Oogenesis adalah perubahan bentuk dari oogonia menjadi oosit yang meliputi tiga tahapan yaitu proliferasi, pertumbuhan dan perkembangan menjadi dewasa (*maturity*) (Hardjoprano, 1995). Proses oogenesis bersamaan dengan proses folikulogenesis (Gambar 2.4). Pada proses oogenesis terjadi proliferasi yaitu mitosis oogonium menjadi sejumlah oogonia di ovarium yang terjadi saat pralahir sampai lahir atau beberapa saat pasca lahir (segera sesudah partus) (Toelihere, 1985). Oogonia akan berdiferensiasi menjadi oosit primer dengan inti pada profase I (tahap diploten) serta dikelilingi oleh epitel pipih yang disebut folikel primordial.

Tahapan pertumbuhan selanjutnya dimulai setelah mencapai usia dewasa kelamin, dimana pertambahan diameter oosit menjadi dua sampai tiga kali lipat dan ditandai dengan kandungan sitoplasma bertambah banyak, bertambahnya membran sel (zona pelusida) dan terjadinya proliferasi sel granulosa (Gambar 2.4). Tahapan terakhir yaitu tahapan pematangan atau *maturity* ditandai dengan perubahan pada morfologi inti sel yaitu perubahan korteks granula ke perivetelin serta meningkatnya jumlah mitokondria. Beberapa membran inti mengadakan penyatuhan dengan vesikel kemudian memberan inti tersebut lepas setelah beberapa saat *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD). Pada hewan yang telah mencapai dewasa kelamin, oosit bertahan pada tahap diploten yang diperpanjang dengan adanya FSH dan LH sehingga oosit akan berkembang menuju tahap selanjutnya sampaiiovulasikan (Hafez dan Hafez, 2000).

Oosit yang digunakan dalam penelitian adalah oosit primer yang dipilih melalui seleksi berdasarkan standar dan kriteria tertentu menggunakan mikroskop terhadap oosit muda yang lengkap struktur morfologinya dengan adanya zona pelusida, dan sel kumulus. Oosit yang demikian mampu melanjutkan ke tahap perkembangan selanjutnya, sesuai dengan pendapat Hyttel (1997). Menurut Hardjoprano (1995), ovarium pada golongan mamalia mengalami proses pembentukan oosit yang terjadi dengan urutan sebagai berikut:

1. Tahap proliferasi

Tahap ini terjadi sebelum dilahirkan sampai beberapa saat setelah lahir. Pada tahap ini germinal epithelium bermitosis sehingga terbentuk oogonia, kemudian membentuk oosit primer. Oosit primer akan bertahan (*arrested*) sampai hewan betina mencapai dewasa kelamin (pubertas).

2. Tahap pertumbuhan

Tahap pertumbuhan oosit akan terjadi secara periodik setelah lahir sampai mencapai masa pubertas. Pertumbuhan oosit bersifat terus menerus, ada yang

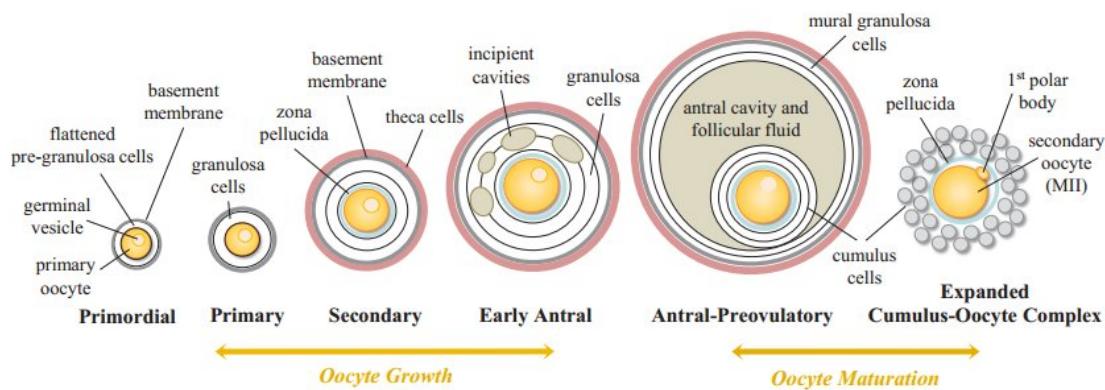
diakhiri dengan ovulasi, tetapi ada juga yang mengalami degenerasi. Oosit tumbuh secara penuh ditandai pada sitoplasma terdapat penambahan jumlah protein dan organel sel, zona pellusida berkembang, terjadi pertumbuhan yang pesat dari sel-sel folikel yang mengelilingi oosit pada akhir tahap ini, terbentuk oosit primer di dalam folikel disusul dengan pembentukan rongga folikel (antrum).

3. Tahap pemasakan

Tahap ini terjadi pada hewan betina yang telah mencapai pubertas. Pada fase proestrus sampai estrus dari setiap siklus birahi, terjadi perubahan oosit primer menjadi oosit sekunder, ootid dan ova sebagai oosit yang dewasa. Pembelahan reduksi terjadi pada tahap ini sehingga jumlah kromosom menjadi setengahnya.

2.4. Diameter oosit

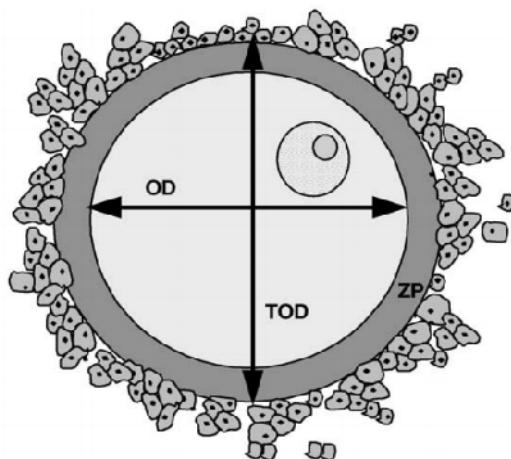
Perkembangan oosit dimulai saat terjadinya diferensiasi dari sel germinal primordial yang berproliferasi menjadi oogonia sebelum memasuki proses meiosis untuk menjadi oosit primer (McLaughlin dan McIver, 2009). Oosit primer yang berada pada fase profase 1 (diploten) dikelilingi oleh selapis sel tunggal granulosa dan membran dasar untuk membentuk folikel primordial (Gambar 2.4). Selama proses folikulogenesis, folikel primordial dapat mengalami degenerasi atau terus tumbuh sampai mencapai folikel *degraaf* (McLaughlin dan McIver, 2009). Proses proliferasi folikel primordial sampai menjadi folikel antral disertai dengan proses pertumbuhan dan perkembangan oosit (oogenesis), perkembangan sel granulosa, sel teka, dan terbentuknya antrum (Findlay *et al.*, 1996).



Gambar 2.4. Pertumbuhan dan perkembangan oosit

Selama pertambahan ukuran folikel, oosit primer yang ada di dalam folikel akan mengalami pertambahan ukuran diameter dan volume sebanyak 100-300 kali lipat (Griffin *et al.*, 2006) yang disebabkan adanya proses sintesis ribosom dan mRNA dalam jumlah besar. Ribosom dan mRNA selanjutnya akan melakukan sintesis protein yang diperlukan untuk fase selanjutnya dalam maturasi oosit dan fase perkembangan setelah fertilisasi oosit (Johnson dan Everitt, 2007) (Gambar 2.4). Pertambahan volume dan ukuran diameter oosit disebabkan juga akibat adanya akumulasi air, ion, karbohidrat, lipid (Fair *et al.*, 1997) dan meningkatnya jumlah organel seperti retikulum endoplasma, ribosom, mitokondria, kortex granular dan akumulasi mRNA (Hytte *et al.*, 1997).

Diameter oosit yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ukuran diameter oosit (sitoplasma dan nukleus) beserta ukuran zona pellusida (Lucas *et al.*, 2002) (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Pengukuran diameter oosit beserta zona pellusida

Keterangan: OD) diameter oosit tanpa zona pellusida; TOD) diameter oosit beserta zona pellusida; ZP) zona pellusida (Lucas *et al.*, 2002).

Kompetensi perkembangan oosit diperoleh selama oosit tumbuh dan berkembang, dimana banyak proses metabolisme yang terjadi selama oosit tumbuh dan saat proses maturasi yang membutuhkan energi. Kebutuhan energi tersebut diperoleh dari persiapan akumulasi karbohidrat dan protein yang telah dipersiapkan dalam oosit (Collado-fernandez *et al.*, 2012). Diketahui bahwa oosit membutuhkan modifikasi intraselular selama proses perkembangan folikel sebelum oosit tersebut dapat memiliki kompetensi perkembangan penuh untuk dapat menyelesaikan maturasi inti, fertilisasi dan pembentukan embrio. Berdasarkan kondisi tersebut, diameter oosit dapat digunakan sebagai kriteria seleksi oosit dalam proses maturasi *in vitro* (Evecen *et al.*, 2010).

2.5. Cairan Folikel

Cairan folikel merupakan cairan yang mengisi folikel yang berada diantara oosit dengan membran folikel. Cairan folikel ini mengandung hormon, protein, dan unsur lainnya yang dibutuhkan oleh oosit untuk mencapai tingkat matang sehingga kondisi cairan folikel merupakan lingkungan yang sangat mendukung perkembangan oosit. Cairan folikel berasal dari plasma peripheral yang ditransudasi (diserap) melalui basemen lamina folikel dan tarakumulasi dalam cairan antrum. Cairan folikel merupakan penyerapan serum dari hasil aktivitas metabolit yang terdiri dari unsur-unsur yang spesifik seperti steroid dan glikoprotein yang disintesis sel dalm dinding folikel (Hafez dan Hafez, 2000). Awal terbentuknya antrum adalah permulaan perkembangan folikel de Graaf dimana munculnya kavitas atau ruang yang berisi cairan pada salah satu kutub dari oosit (Anwar, 2005). Pada antrum terkandung sejumlah unsur-unsur penting seperti protein, asam amino, enzim, glikoprotein, steroid, prostaglandin, immunoglobulin dan mineral lain.

Penggunaan cairan folikel sebagai suplementasi media maturasi *in vitro* berpengaruh terhadap ekspansi sel-sel kumulus (Yoshida *et al.*, 1992), perkembangan oosit pada tahapan metafase II (Jones *et al.*, 2009) dan perkembangan embrio (Khatir *et al.*, 1997; Samad *et al.*, 1999). Hal ini dikarenakan cairan folikel terdiri dari faktor-faktor yang menstimulasi kematangan oosit, seperti *insulin-like growth factor* I (IGF-I), IGF binding proteins (IGFBP) (Gordon, 1994; Guthrie *et al.*, 1995), *follicles stimulating hormon* (FSH), *luteinizing hormon* (LH), estrogen, progesterone (Latifa, 2007) dan estradiol (Smith *et al.*, 1996; Ginther *et al.*, 1997). Menurut Tabatabaei *et al.*, (2010), komposisi biokimia cairan folikel di dalam folikel besar (diameter 10-22 mm) antara lain kalsium, phosphorus, glukosa, urea, keratin, kolesterol, trigliserida, protein, albumin dan globulin. Penelitian yang dilakukan memaparkan bahwa level komposisi cairan folikel dipengaruhi oleh ukuran folikel (Guthrie *et al.*, 1995; Tabatabaei *et al.*, 2010).

2.6. Maturasi Oosit secara *In Vitro*

Maturasi oosit merupakan perubahan oosit primer menjadi oosit tersier melalui serangkaian proses biologi yang kompleks. Maturasi oosit merupakan hasil pembelahan meiosis dari tahapan prophase dari meiosis I sampai pada tahapan metafase dari meiosis II (Gordon, 1994). Maturasi oosit terdiri dari dua proses yang berbeda antara maturasi nukleus dan sitoplasma, dimana maturasi oosit harus mencakup maturasi nukleus dan sitoplasma (Widayati, 1999). Keduanya akan saling berkoordinasi untuk menjamin kualitas oosit (Adifa, 2009).

Pematangan oosit *in vitro* adalah pematangan oosit pada medium di luar tubuh dan dikultur secara *in vitro* (Gotto *et al.*, 1995). Adanya teknik pematangan *in vitro* dimungkinkan untuk memperoleh oosit matang dalam jumlah besar dengan cara mengkultur oosit yang belumiovulasikan dalam medium kultur (Bavister *et al.*, 1992). Shamsudin *et al.*, (1993) menyatakan bahwa pematangan oosit primer dapat berkembang menjadi oosit sekunder yang akan melakukan proses pembelahan meiosis dengan normal dan sempurna sehingga menghasilkan oosit yang siap untuk dibuahi. Oosit yang dimaturasi secara *in vitro* akan mengalami ekspansi sel kumulus dan terjadinya perubahan ruang privitelin dengan terbentuknya badan polar I dan gelendong di permukaan vitelina pada metafase II (Gordon, 1994). Ekstruksi badan polar I merupakan indikasi dari proses meiosis dan keberhasilan dalam tahapan metafase II. Sel kumulus sangat berperan dalam maturasi oosit dengan jalan mempengaruhi kelanjutan meiosis dan maturasi sitoplasmik. Fungsi ini berkaitan dengan adanya *gap junction* dan kemampuan metabolisme. *Gap junction* berperan dalam transfer nutrient dan faktor penting dalam perkembangan oosit (Gordon, 1994). Adifa (2009) menuturkan ciri-ciri oosit matang yang mudah diamati adalah adanya ekspansi sel-sel kumulus disekitar oosit dan zona pelusida yang terlihat jelas.

2.7. Faktor yang mempengaruhi pematangan Oosit

1. Kualitas Oosit *Immature*

Kualitas oosit *immature* umumnya ditentukan berdasarkan penelitian visual dari kumpulan banyaknya sel folikel. Oosit *immature* dibedakan menjadi tiga kategori berdasarkan Wang *et al.*, (2007) yaitu:

- Kategori A, oosit dikelilingi oleh sel-sel kumulus dengan jumlah yang banyak (lebih dari 3 lapis) dan kompak dengan ooplasma yang homogen.
- Kategori B, sel-sel kumulus hanya mengelilingi sebagian oosit atau oosit hanya dikelilingi oleh kurang dari 3 lapis sel-sel kumulus dengan ooplasma yang homogen.
- Kategori C, oosit tidak dilapisi oleh sel-sel kumulus atau oosit hanya sedikit dikelilingi oleh sel kumulus.

2. Media Pematangan Oosit

Proses *in vitro* harus memiliki empat komponen dasar dalam medium yaitu: medium dasar, serum, aditif dan sistem penyangga (Smith, 1990). Bavister *et al.*, (1992) melaporkan bahwa *Tissue Culture Medium* TCM-199 adalah suatu media yang bagus untuk pematangan oosit secara normal. Pemilihan TCM-199 ini sebagai medium dasar untuk *in vitro* maturation, karena di dalamnya mengandung biokimia seperti asam amino, vitamin, glukosa dan garam anorganik yang berperan dalam perkembangan oosit selama *in vitro* maturation.

Diantara cairan biologis yang terbukti dapat menunjang pertumbuhan diluar tubuh adalah serum. Menurut Smith (1990) serum merupakan suatu campuran yang kompleks dari berbagai biomolekul yang kecil maupun yang besar dan memiliki bermacam-macam aktifitas pendorong dan penghambat pertumbuhan yang berada dalam keseimbangan fisiologis. Fungsi utama serum adalah untuk menyediakan faktor hormonal, mineral dan lemak.

3. Derajat Keasaman (pH)

Sebagian besar pertumbuhan organisme sangat dipengaruhi oleh perubahan derajat keasaman (pH), artinya setiap organisme mempunyai pH optimum dalam pertumbuhannya, terutama yang berkaitan dengan proses metabolisme sel dalam permibilitas membran sel (Smith, 1990).

Faktor-faktor yang mengganggu stabilitas pH dalam medium menurut Malole (1990) adalah kemampuan buffer, jenis medium, luas ruangan diatas sel dan kadar glukosa. Sistem buffer yang biasa terdapat dalam medium adalah sistem karbondioksida bikarbonat untuk mencegah keluarnya CO₂ yang berarti meningkatkan konsentrasi ion hidroksil akibatnya pH menjadi rendah, oleh karena itu perlu diusahakan agar diatas medium cukup luas untuk mempertahankan pH dalam waktu yang cukup lama.

4. Temperatur

Persentase oosit matang tertinggi diperoleh pada medium kultur TCM-199 dalam inkubator pada suhu 39°C selama 26 jam dengan 5% CO₂. Gotto *et al* (1995), menambahkan bahwa sesudah diaspirasi dari folikel, oosit tidak dapat disimpan dalam suhu rendah, karena mikrotubul *bovine* oosit sangat sensitif terhadap suhu rendah, sehingga proses perkembangan tahapan meiosis tidak dapat berjalan.

2.8. Kerangka Konseptual Penelitian

In vitro production (IVP) merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang dimanfaatkan untuk memahami kontrol dan mekanisme maturasi oosit. Pada proses IVP diketahui bahwa IVM memegang peranan penting dalam keberhasilan IVP.

In vitro maturation merupakan proses pematangan oosit *immature* pada medium yang diperkaya hormon, protein dan *growth factor* sampai mencapai metafase II. Komponen utama yang dibutuhkan dalam keberhasilan IVM adalah oosit *immature* dengan kualitas seragam dan medium maturasi yang mendukung perkembangan oosit, namun diketahui bahwa oosit *immature* yang diperoleh dari aspirasi memiliki kualitas yang beragam, sehingga perlu dilakukan seleksi. Selama ini secara umum, seleksi oosit didasarkan pada jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilingi oosit, namun seleksi oosit berdasarkan kriteria sel kumulus masih bersifat subjektif sehingga masih diperoleh oosit yang beragam. Berdasarkan hal tersebut, pemilihan oosit untuk keperluan maturasi *in vitro* perlu memenggunakan kriteria tambahan berupa ukuran diameter oosit. Penggunaan kriteria diameter oosit dalam seleksi oosit *immature* dikarenakan kemampuan oosit untuk memasuki proses meiosis dan mencapai metafase II ditentukan oleh diameter oosit. Selanjutnya diketahui bahwa pada hanya pada ukuran tertentu oosit memiliki kemampuan untuk berkembang setelah diproses secara *in vitro*.

Selama proses folikulogenesis dan oogenesis, oosit mengalami pertambahan diameter sebagai akibat dari perubahan fisiologi sitoplasma dan nukleus. Perubahan kondisi fisiologi intraseluler ini dibutuhkan oleh oosit untuk mendapatkan kompetensi perkembangan pada proses meiosis yaitu dari proses *germinal vesicle* (GV) menuju metafase II (M-II). Hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa diameter oosit *immature* berkorelasi positif terhadap kemampuan oosit untuk mencapai M-II pada kondisi *in vitro*.

Selain kualitas oosit, penggunaan medium yang tepat juga merupakan salah satu komponen yang menentukan dalam keberhasilan maturasi *in vitro*. Medium yang digunakan dibuat semirip mungkin dengan kondisi *in vivo* untuk menunjang perkembangan oosit sampai tahap M-II, sehingga umumnya medium diberikan suplementasi berupa serum, protein, dan hormon. Selama ini suplementasi hormon dan serum yang umum digunakan dalam medium maturasi *in vitro* berasal dari industri farmasi, namun dengan konsekuensi harga yang relatif mahal dan pada daerah tertentu sulit didapat. Keadaan ini mendorong dibutuhkannya bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai suplementasi

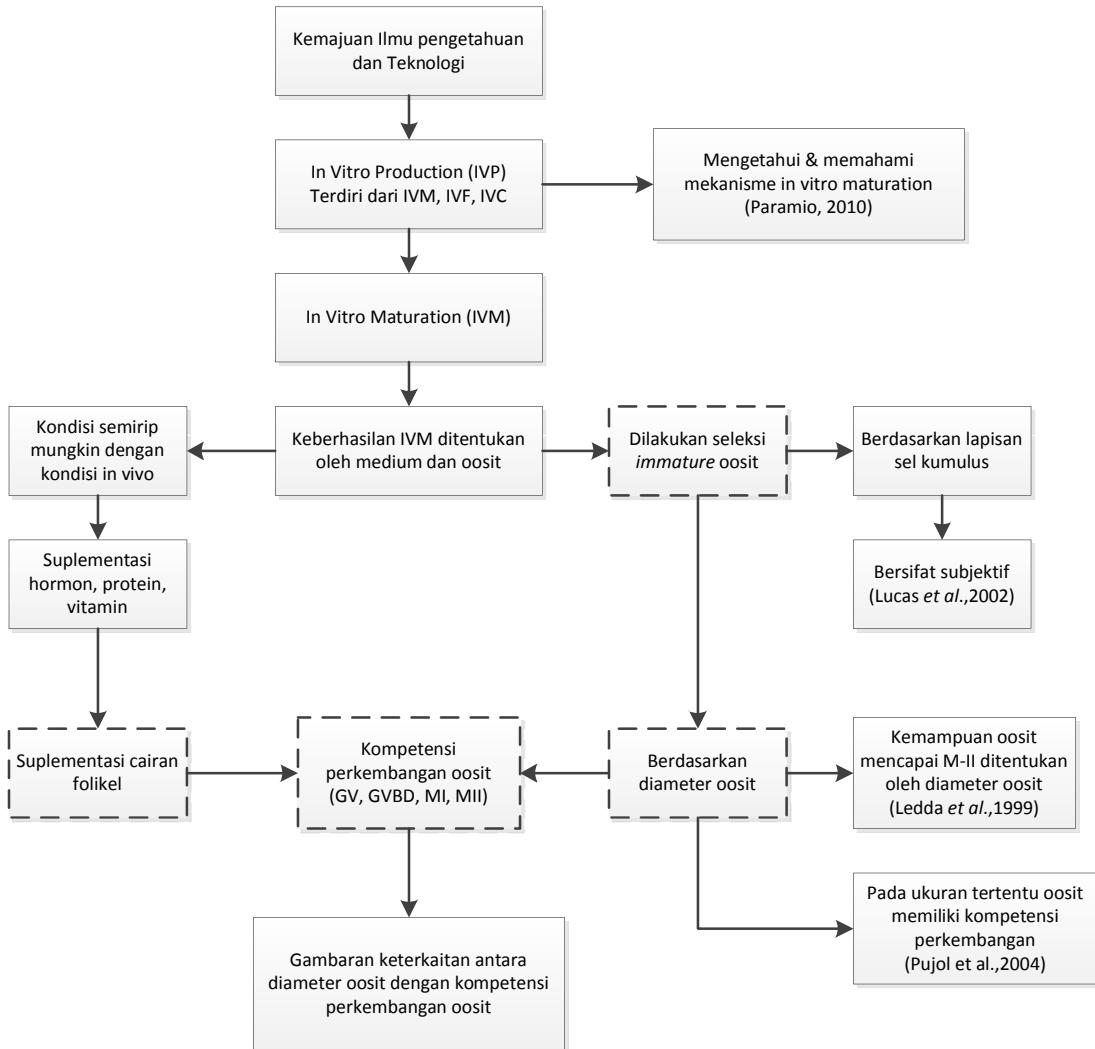
medium maturasi *in vitro*. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai bahan suplementasi medium maturasi *in vitro* adalah cairan folikel.

Cairan folikel merupakan cairan yang terakumulasi dalam rongga folikel yang memainkan peranan penting dalam folikulogenesis, maturasi oosit, menutrisi sel granulosa, luteinisasi dan ovulasi. Cairan folikel diketahui mengandung bahan yang dapat menstimulasi maturasi oosit seperti *peptide growth factor* yang dipercaya berperan sebagai kunci dalam perkembangan oosit secara *in vivo* mencapai maturasi inti. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dilaporkan juga bahwa cairan folikel mengandung *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP), FSH, LH, dan beberapa nutrien yang berperan dalam *inhibitory factor*. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa cairan folikel sukses sebagai suplementasi medium dalam maturasi *in vitro*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang pengaruh diameter oosit *immature* terhadap kompetensi perkembangan oosit dan memberikan gambaran bagaimana pengaruh suplementasi cairan folikel pada medium maturasi terhadap kompetensi perkembangan oosit. Kerangka konseptual penelitian dijabarkan secara sistematis pada Gambar 2.6.

2.9. Hipotesis Penelitian

1. Diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit yang meliputi ekspansi kumulus dan tingkat maturasi oosit (M-II).
2. Suplementasi cairan folikel berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit yang meliputi ekspansi kumulus dan tingkat maturasi oosit (M-II).



Gambar 2.6. Kerangka konseptual penelitian

Keterangan: Garis kotak putus-putus merupakan fokus penelitian yang dilakukan

BAB III

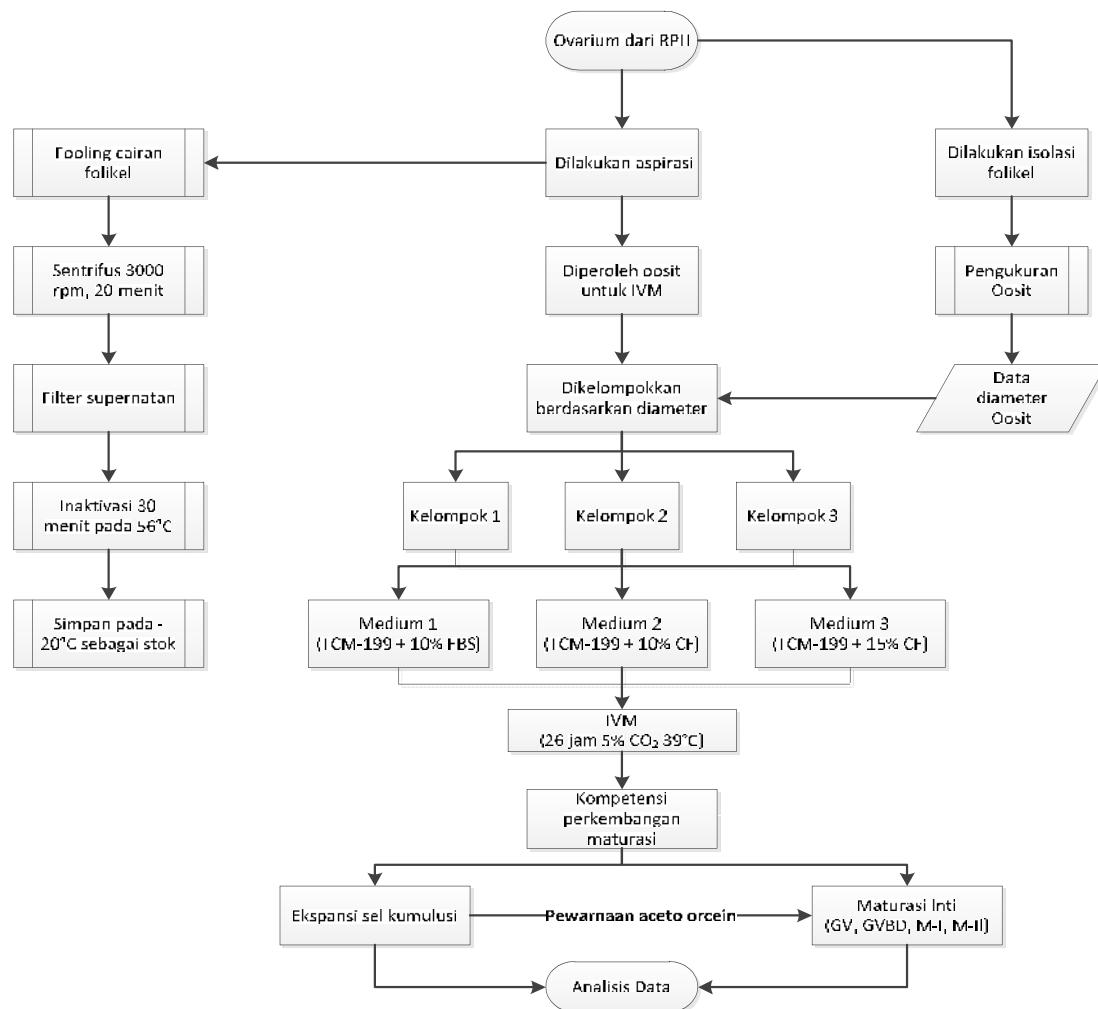
METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH-UB) pada Laboratorium sel dan kultur embryo. Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari 2013 sampai bulan November 2013.

3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional penelitian , secara umum dijabarkan sebagai berikut:



Gambar 3.1. Kerangka operasional penelitian

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Penelitian menggunakan oosit *immature* yang diperoleh dari ovarium kambing lokal dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Sukun, Malang. Ovarium yang digunakan berasal dari kambing betina dewasa (pubertas) tanpa memperhatikan siklus birahi.

Bahan-bahan yang digunakan berupa NaCl fisiologis, streptomycin, penicillin, Phosphate Buffered Saline (PBS), Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA), Acetic Glacial Acid, TCM-199 (Gibco, USA), Venstrep, HCl, NaOH, NaHCO₃, farapin oil, aceto-orcein, aquades, ethanol dan cairan folikel.

3.3.2 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah laminar air flow (Faster Bio60), mikroskop stereo (Olympus SZX2, Japan), mikroskop inverted (Olympus IX71, Japan), inkubator CO₂, autoklaf (Tomy), open pengering, freezer, waterbath (Barnstead Lab Line, 18002A-ICE), hot plate, mikro pipet, tip mikro pipet, *dismissible syringe* 10 ml dengan needle berukuran 18 G (Terumo), petridish gelas, *dismissible tissue culture dish* (Corning), filter miliphore (Sartorius stedim), tabung eppendorf 15 ml (Corning, Mexico), gelas ukur, beker glass, tabung reaksi, labu erlenmeyer, surgical blade no 11 (Lotus), pinset, botol, termos, object glass, cover glass, selang infus, mikro hematokrit (Assistent), tissue steril, pH meter (Beckman), sentrifuge (LW Scientific, EZ swing 5K), timbangan/analytical balance (sartorius).

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tujuh tahapan. Tahapan tersebut meliputi pengambilan ovarium, eksplorasi ukuran diameter oosit, pengambilan cairan folikel, koleksi oosit, persiapan medium IVM, pematangan oosit, dan pengamatan kompetensi maturasi oosit.

3.4.1 Pengambilan Ovarium

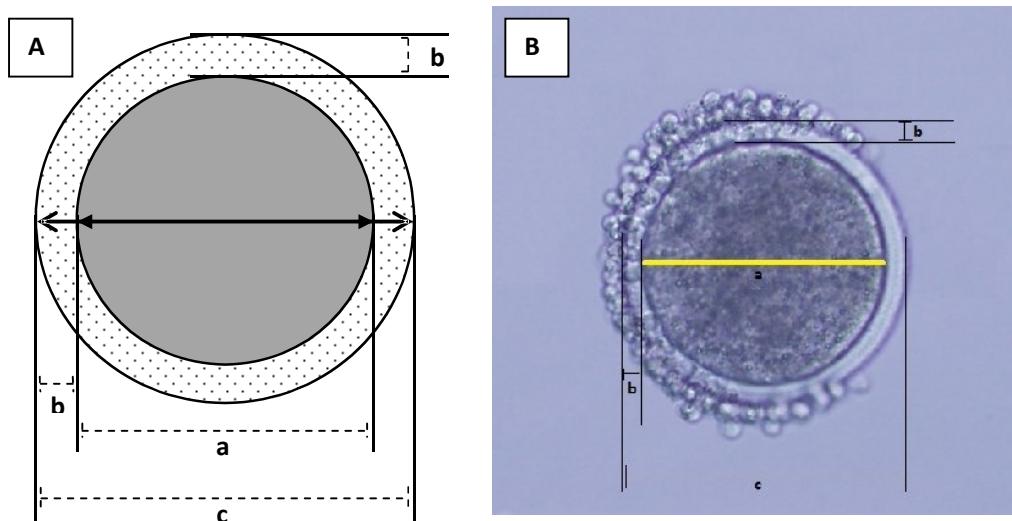
Ovarium kambing diperoleh dari RPH Sukun, Kota Malang dalam keadaan segar setelah kambing dipotong. Ovarium dibersihkan dari organ reproduksi lainnya kemudian dicuci dan dimasukkan ke dalam botol berisi NaCl fisiologis yang telah ditambahkan streptomisin 0.01 gr/10 ml dan penicillin 0.006 gr/10 ml. Botol dimasukkan ke dalam termos berisi air hangat dengan suhu berkisar antara 35-37°C dan dibawa menuju LSIH-UB dengan jarak tempuh 40 menit. Setelah tiba di

laboratorium, botol berisi ovarium dimasukkan di waterbath dengan suhu 37°C sebelum dilakukan isolasi folikel, aspirasi oosit maupun pengumpulan cairan folikel.

3.4.2 Eksplorasi Ukuran Diameter Oosit *immature*

Eksplorasi diameter oosit dilakukan untuk mengetahui rentang diameter oosit yang ada pada ovarium kambing. Eksplorasi dilakukan dengan mengisolasi folikel permukaan ovarium berukuran 2-7 mm (Crozet *et al.*, 1995 dan Heleil dan Fayed, 2010) menggunakan *surgical blade* nomor 11. Folikel hasil isolasi diletakkan pada petridish berisi PBS. Folikel kemudian diukur dengan menggunakan *micrometer eyepiece* (Griffin *et al.*, 2006) pada mikroskop stero (Olympus SZX2, Japan) yang sebelumnya telah dikalibrasi dengan micrometer objek.

Folikel yang telah diisolasi kemudian disayat untuk mengeluarkan oosit yang ada di dalamnya. Oosit yang diperoleh kemudian diukur diameternya menggunakan *micrometer eyepiece* dan dikonversi menjadi micrometer (μm). Diameter oosit *immature* yang diukur adalah diameter oosit beserta zona pelusida (Gambar 3.2) (Lucas *et al.*, 2002). Hasil eksplorasi diameter oosit selanjutnya digunakan untuk membagi oosit *immature* menjadi tiga kelompok berdasarkan diameter yang dimiliki.



Gambar 3.2. Cara pengukuran diameter oosit *immature*.

Keterangan gambar: A) bagan pengukuran oosit, B) contoh pengukuran pada oosit *immature*, a) diameter oosit, b) zona pellusida, c) diameter oosit *immature* dengan zona pellusida.

3.4.3 Pengumpulan Cairan Folikel

Cairan folikel yang digunakan sebagai suplementasi medium TCM-199 adalah *goat follicular fluid* (GFF) yang diperoleh dari folikel ovarium kambing lokal dengan sistem pooling (Isobe dan Terada, 2001). Proses pengumpulan dan penyimpanan cairan folikel yang digunakan mengikuti langkah yang dilakukan Haque *et al* (2012) dengan modifikasi. Cairan folikel yang digunakan diambil dari folikel berukuran 3-8 mm yang diaspirasi menggunakan *disposable syringe* 10 ml dengan sputit berukuran 18 G. Cairan folikel selanjutnya di-pooling pada tabung eppendorf dan disentrifus 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan cairan folikel dengan sel granulosa dan oosit. Supernatan difilter menggunakan milipore filter 0.22 μm dan dimasukkan pada tabung eppendorf steril. Cairan folikel kemudian diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit di waterbath dan disimpan di dalam freezer dengan suhu -20°C (Hua *et al.*, 2011) sebagai stok sampai digunakan.

3.4.4 Persiapan Media IVM

Pembuatan medium kultur IVM dilakukan dengan membuat medium stok TCM-199 sebanyak 100 ml yaitu dengan mencampurkan 0.95 gr bubuk TCM-199, ditambah 0.22 NaHCO₃, ditambahkan penicillin 0.006 gr, ditambahkan streptomycin 0.01 gr dan ditambahkan DI sampai 100 ml kemudian dihomogenkan dan disimpan sebagai stok medium. Medium IVM yang digunakan pada penelitian terdiri dari 3 jenis, yaitu medium 1 (TCM-199 + pentsrep + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + penstrep + 10% cairan folikel), medium 3 (TCM-199 + penstrep + 15% cairan folikel). Masing-masing jenis medium dibuat menjadi 3 drop pada 2 *dispossible tissue culture dish* (35 mm x 10 mm) dengan masing-masing drop sebanyak 100 μl kemudian ditutup menggunakan paraffin oil.

Medium IVM yang telah dibuat dalam bentuk drop dan telah ditutup paraffin oil kemudian diequilibrasi di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 39°C minimal selama 2 jam sebelum digunakan.

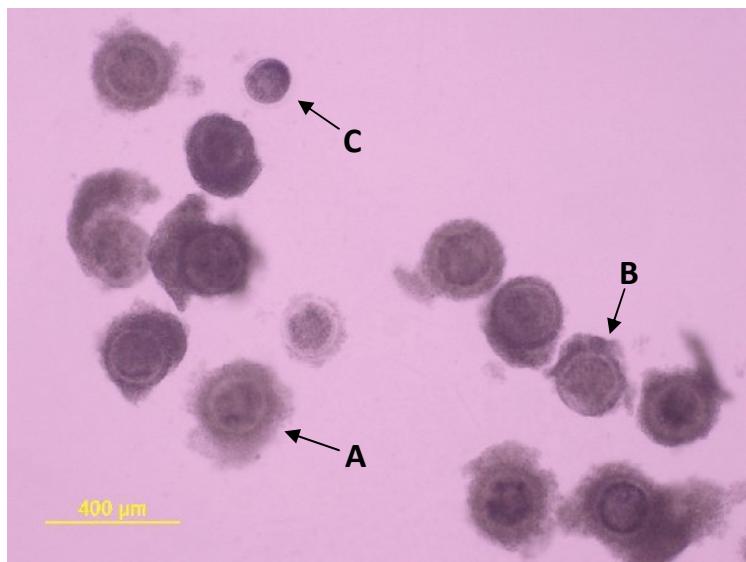
3.4.5 Koleksi Oosit

Koleksi oosit dilakukan untuk mendapatkan oosit yang akan digunakan pada IVM. Oosit dikoleksi dari folikel antral ovarium dengan teknik aspirasi menggunakan *dispossible syringe* 10 ml dengan sputit berukuran 18 G yang berisi 0.5 ml medium *washing*. Teknik aspirasi dilakukan dengan menyedot cairan folikel yang ada pada ovarium. Penyedotan ini dimaksudkan untuk mendapatkan oosit yang ada di dalam folikel. Cairan folikel hasil aspirasi folikel ovarium selanjutnya dipindah ke dalam

tabung reaksi steril untuk diendapkan selama 5 menit. Endapan yang ada pada dasar tabung reaksi kemudian dipindahkan menggunakan mikropipet dan ditempatkan pada petridish berisi medium *washing*. Oosit selanjutnya diseleksi pada mikroskop stereo kemudian dilakukan *washing* sebanyak 3 kali dan selanjutnya oosit dikelompokkan berdasarkan kelompok diameter yang telah ditentukan.

Oosit *immature* yang digunakan untuk IVM pada penelitian ini dipilih berdasarkan kriteria diameter yang telah ditentukan pada eksplorasi diameter oosit dan jumlah lapisan kumulus oosit kompleks yang mengelilingi oosit. Kriteria jumlah lapisan kumulus oosit kompleks pada oosit *immature* yang digunakan dalam IVM adalah oosit dengan kategori A dan B berdasarkan pembagian menurut Wang *et al* (2007) yaitu:

- Kategori A atau oosit kualitas baik memiliki ciri oosit dikelilingi oleh sel-sel kumulus dengan jumlah banyak (lebih dari 3 lapis) dan kompak dengan ooplasma yang homogen.
- Kategori B atau oosit kualitas sedang memiliki ciri sel-sel kumulus hanya mengelilingi sebagian oosit atau oosit hanya dikelilingi oleh kurang dari 3 lapis sel-sel kumulus dengan ooplasma yang homogen.
- Kategori C atau oosit kualitas buruk memiliki ciri oosit tidak dilapisi oleh sel-sel kumulus atau oosit hanya dikelilingi selapis sel kumulus.



Gambar 3.3. Pembagian oosit *immature* kambing berdasarkan kriteria sel kumulus.
Keterangan gambar: A) oosit *immature* kualitas A, B) oosit *immature* kualitas B,
C) oosit *immature* kualitas C.

Pemisahan oosit *immature* berdasarkan pembagian grup yang telah ditentukan dilakukan pada proses pencucian ketiga sebelum akhirnya ditransfer pada medium IVM yang telah diquilibrasikan pada inkubator CO₂.

3.4.6 Maturasi Oosit secara *In Vitro*

Proses maturasi oosit *immature* dilakukan pada 3 jenis medium yang telah disediakan. Oosit *immature* yang telah dibedakan menurut diameternya kemudian dikultur dalam 100 µl drop medium (setiap 100 µl diisi 5 sampai 10 oosit *immature*). Pemindahan oosit *immature* ke dalam drop medium dilakukan dengan menggunakan tabung mikrohematokrit. Maturasi oosit dilakukan pada inkubator CO₂ dengan suhu 39° C dengan tingkat CO₂ sebesar 5% selama 26 jam (Boediono *et al.*, 1999). Oosit *immature* yang telah *mature* ditandai dengan ekspansi kumulus dan adanya polar body I (PB I) yang menandakan bahwa oosit berada dalam tahap M-II.

3.4.7 Pengamatan Kompetensi Perkembangan Maturasi Oosit

3.4.7.1 Ekspansi Kumulus

Oosit yang telah diinkubasi selama 26 jam, diamati pada mikroskop inverted dengan perbesaran 200x untuk melihat tingkat ekspansi dari sel kumulus. Ekspansi sel kumulus pada oosit yang telah *mature* dapat dilihat dengan perkembangan atau pemekaran sel kumulus oosit. Menurut Rahman *et al.*, 2004, tingkat ekspansi sel oosit *mature* dapat dibedakan menjadi 3 kriteria yaitu sebagai berikut:

- Kriteria 1 : sel-sel kumulus terekspansi menyeluruh/sempurna
- Kriteria 2 : sel-sel kumulus terekspansi sebagian
- Kriteria 3 : sel-sel kumulus tidak terekspansi.

3.4.7.2 Pematangan Inti

Pengamatan tingkat maturasi inti dilakukan dengan pewarnaan aceto orcein 1% pada oosit yang telah dikultur selama 26 jam dan mununjukkan ekspansi sel kumulus tingkat 1. Oosit yang telah dimaturasi dipindahkan pada medium washing untuk dilakukan penggundulan dengan bantuan enzim hialuronidase 0.1% (Sigma, USA) dan selanjutnya dilakukan pemipatan secara berulang-ulang terhadap sel kumulus menggunakan mikrohematokrit dengan ukuran yang disesuaikan dengan ukuran oosit. Oosit yang telah gundul diletakkan pada objek *glass* yang telah diberi bantalan vaselin pada empat sudut yang telah digores, kemudian ditutup dan sedikit ditekan secara hati-hati menggunakan *cover glass*. Masing-masing objek *glass* berisi 4 – 10 oosit gundul.

Preparat yang telah berisi oosit gundul kemudian difiksasi pada campuran ethanol dan acetic acid glasial (ethanol:acetic acid glacial, 3:1) selama 3-5 hari pada suhu ruang. Preparat kemudian dikeringkan dari sisa larutan fiksasi kemudian dilakukan pewarnaan (staining) dengan *aceto orcein* 1 % selama kurang lebih 5 menit. Pewarna *aceto orcein* kemudian dibersihkan (destaining) menggunakan *aceto glycerin* dan selanjutnya diamati pada mikroskop phase contrast.

Pengamatan tingkat maturasi inti oosit dilakukan dengan melihat jumlah oosit yang berada pada tahap perkembangan meiosis, meliputi tahap *germinal vesicle* (GV) yang ditandai dengan adanya membran inti dan nukleolus yang terlihat jelas ditepi, *germinal vesicle breakdown* (GVBD) yang ditandai dengan robeknya membran inti sehingga nukleolus tidak terlihat jelas. Tahap metafase I (M-I) ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berpasangan dan berderet di bidang ekuator. Metafase II (M-II) dicirikan dengan adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap M I.

3.5 Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Terdiri dari variabel prediktor berupa diameter oosit *immature* dan jenis medium. Variabel dependen yaitu kompetensi perkembangan maturasi oosit berupa tingkat ekspansi kumulus dan tingkat maturasi inti.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi dengan microsoft exel 2010 dan dianalisis menggunakan SPSS. 20 menggunakan uji ANOVA selang kepercayaan 95% dan apabila terdapat pengaruh secara nyata akan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

BAB IV

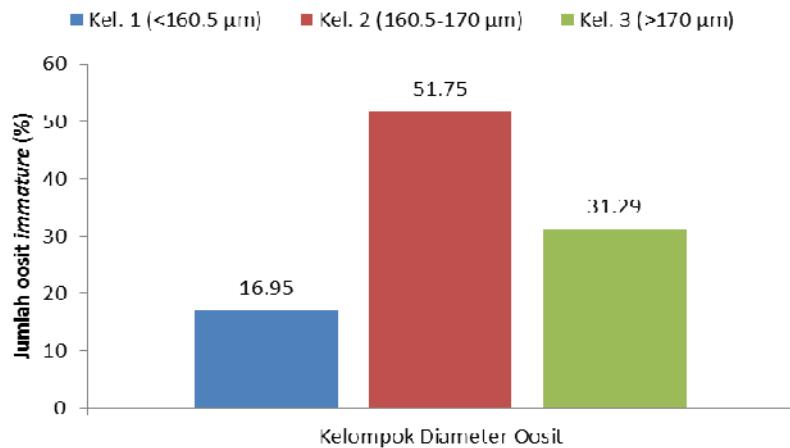
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Eksplorasi ukuran diameter oosit *immature*.

Eksplorasi diameter oosit *immature* dilakukan untuk mengetahui rentang ukuran diameter oosit dan akan digunakan dalam pengelompokan oosit pada penelitian ini. Eksplorasi diameter oosit *immature* menggunakan 342 oosit hasil slicing folikel dari 140 ovarium kambing. Oosit yang diperoleh kemudian diukur menggunakan *micrometer eyepiece*. Hasil eksplorasi diameter oosit *immature* yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk mengelompokkan oosit berdasarkan ukuran diameter yang dimiliki pada proses IVM. Hasil eksplorasi ukuran diameter oosit dapat diikuti pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1.

Tabel 4.1. Hasil eksplorasi ukuran diameter oosit *immature*

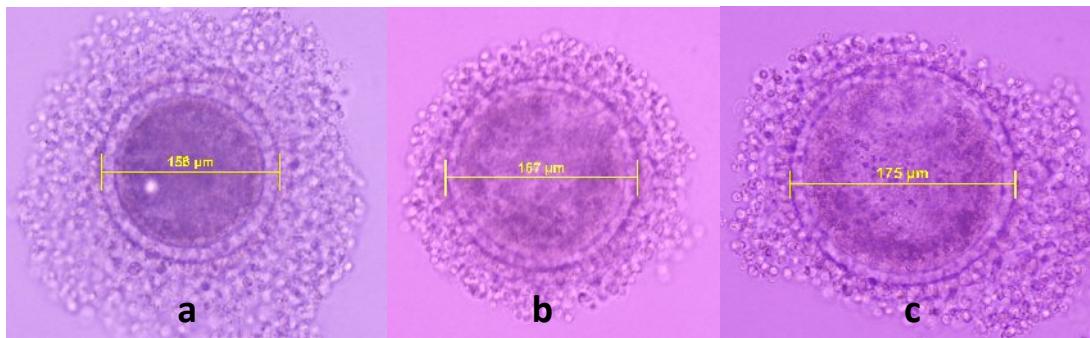
Jumlah Oosit	Diameter Oosit		
	Kelompok 1 (<160.5 μm)	Kelompok 2 (160.5 - 170 μm)	Kelompok 3 (>170 μm)
342	58 (16.95%)	177 (51.75%)	107 (31.29%)



Gambar 4.1. Hasil eksplorasi ukuran diameter oosit *immature*

Berdasarkan Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 menunjukkan bahwa dari 342 oosit yang diukur, terdapat sebanyak 16.95% oosit termasuk dalam kelompok I ($<160.5 \mu\text{m}$), 51.75% oosit termasuk dalam kelompok 2 (160.5-170 μm), dan sebanyak 31.29% oosit masuk dalam kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$). Sebagian besar oosit *immature* yang diperoleh dalam eksplorasi diameter oosit termasuk dalam kelompok 2 (160.5-170 μm) dan kelompok 3

($>170 \mu\text{m}$), yaitu sebanyak 51.75% dan 31.29%. Pada penelitian ini, diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$) disebut sebagai oosit diameter kecil, kelompok 2 (160.5-170 μm) disebut sebagai oosit diameter medium, kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) disebut sebagai oosit diameter besar. Pengelompokan oosit *immature* hasil pengukuran berdasarkan diameter yang dimiliki dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Oosit *immature* berdasarkan kelompok diameter.

Keterangan: a) oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), b) oosit kelompok 2 (160.5-170 μm), dan c) oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$).

Tingginya jumlah oosit hasil aspirasi yang tergolong dalam kelompok diameter 2 atau oosit berdiameter medium (160.5-170 μm) dan kelompok diameter 3 atau oosit berdiameter besar ($>170 \mu\text{m}$) dapat disebabkan karena oosit banyak diperoleh dari folikel berukuran medium (3-5 mm) dan folikel berukuran besar ($>5 \text{ mm}$). Hal ini disebabkan karena diameter oosit umumnya berhubungan dengan ukuran folikel. Ledda *et al* (1999) menyatakan bahwa ukuran diameter oosit akan meningkat seiring dengan pertambahan ukuran folikel. Terdapatnya hubungan antara diameter oosit dan ukuran folikel, sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sayuti *et al* (2007) pada kambing yang menemukan bahwa semakin besar diameter folikel, akan menghasilkan diameter oosit yang semakin besar. Hasil penelitian yang sama juga ditemukan pada babi, tikus, dan hamster yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara diameter folikel dan diameter oosit *immature*, dimana dengan meningkatnya ukuran diameter folikel akan meningkatkan diameter oosit (Griffin *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2002).

Terdapatnya perbedaan diameter oosit hasil aspirasi folikel dari ovarium yang sama dikarenakan oosit tersebut diaspirasi dari folikel dengan ukuran yang berbeda yang memiliki tahap pertumbuhan yang berbeda, sehingga diameter oosit yang dimiliki pun berbeda. Griffin *et al* (2006) menyatakan bahwa pada umumnya diameter folikel berhubungan dengan diameter oosit. Hal ini erat kaitannya dengan proses folikulogenesis dan oogenesi yang mempengaruhi ukuran diameter oosit. Proses pertumbuhan dan

perkembangan dari folikel primordial dalam proses folikulogenesis diketahui dikontrol oleh interaksi antara hormon gonadotropin (FSH dan LH) dan faktor regulasi di dalam ovarium (steroid, sitokin, dan *growth factor*). Proses proliferasi folikel primordial sampai menjadi folikel antral disertai dengan proses pertumbuhan dan perkembangan oosit (oogenesis), perkembangan sel granulosa, sel teka, dan terbentuknya antrum (Findlay *et al.*, 1996). Selama pertambahan ukuran folikel, oosit primer yang ada di dalam folikel akan mengalami pertambahan ukuran diameter yang disebabkan adanya proses sintesis ribosom dan mRNA dalam jumlah besar. Ribosom dan mRNA selanjutnya akan melakukan sintesis protein yang diperlukan untuk fase selanjutnya dalam maturasi oosit dan fase perkembangan setelah fertilisasi oosit (Johnson dan Everitt, 2007). Pertambahan volume dan ukuran diameter oosit disebabkan juga akibat adanya akumulasi air, ion, karbohidrat, lipid (Fair *et al.*, 1997) dan meningkatnya jumlah organel seperti retikulum endoplasma, ribosom, mitokondria, korteks granular dan akumulasi mRNA (Hyttel *et al.*, 1997).

Pada penelitian ini, oosit *immature* dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan rentang diameter yang dimiliki (<160.5, 160.5-170, dan >170 μm). Diketahui selama ini tidak terdapat standar baku dalam proses pengelompokan diameter oosit. Umumnya pembagian berdasarkan rentangan diameter yang diperoleh sehingga sering terdapat perbedaan dalam pengelompokan oosit pada peneliti yang berbeda. Pada sapi, penelitian yang dilakukan Arlotto *et al* (1996) mengelompokkan oosit menjadi 4 kelompok diameter yaitu 95-104, 105-114, 115-124 dan 125-134 μm . Otoi *et al* (1997) pada penelitiannya, mengelompokkan oosit sapi menjadi 6 kelompok (<110, 110-114, 115-119, 120-124, 125-129 dan $\geq 130 \mu\text{m}$). Penelitian yang dilakukan Raghu *et al* (2002) pada kerbau, membagi diameter oosit menjadi 4 kelompok yaitu <126, 127-144, 145-162, dan >163 μm). Perbedaan ukuran dan cara pengelompokan ukuran oosit disebabkan oleh perbedaan pada keturunan, jenis, dan asal hewan serta metode pengukuran yang digunakan (Catala, 2012).

4.2 Hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus.

Oosit yang telah diukur dan dikelompokkan berdasarkan diameter selanjutnya diamati kualitas sel kumulus yang mengelilinginya (Gambar 4.4). Data hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus ditampilkan pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.3.

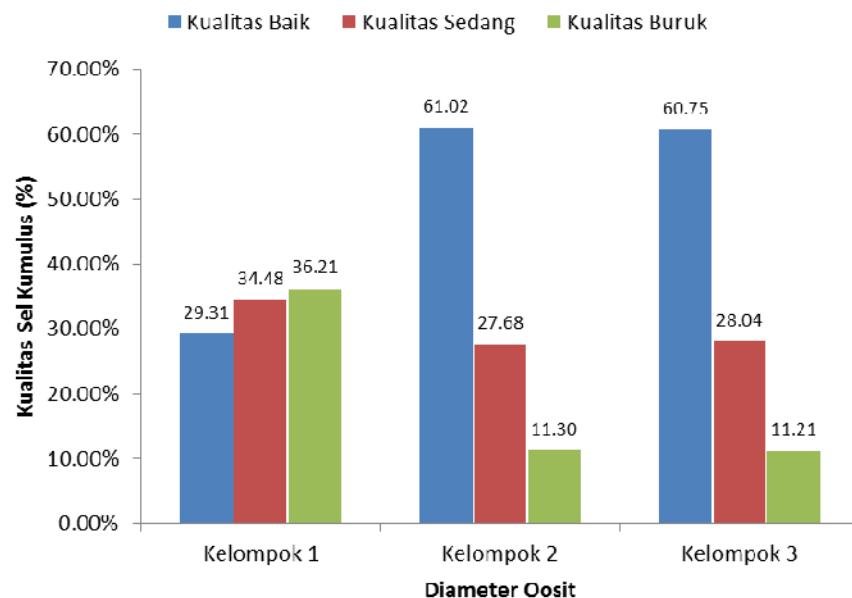
Berdasarkan hasil analisis data, menunjukkan bahwa terdapat hubungan positif antara diameter oosit terhadap kualitas sel kumulus ($p < 0.05$). Hasil menunjukkan bahwa pada oosit kelompok 1 atau oosit berdiameter kecil (<160.5 μm), diperoleh oosit dengan kualitas sel kumulus berkategori baik sebanyak 29.31%, kualitas kategori sedang sebanyak

34.48% dan oosit dengan kualitas sel kumulus kategori buruk sebanyak 36.21%. Analisis data hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 4.2. Hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Kualitas Sel Kumulus (%)		
		Baik	Sedang	Buruk
Kelompok 1 (<160.5 μm)	58	17 (29.31) ^a	20 (34.48) ^a	21 (36.21) ^b
Kelompok 2 (160.5-170 μm)	177	108 (61.02) ^c	49 (27.68) ^b	20 (11.30) ^{ab}
Kelompok 3 (>170 μm)	107	65 (60.75) ^b	30 (28.04) ^a	12 (11.21) ^a

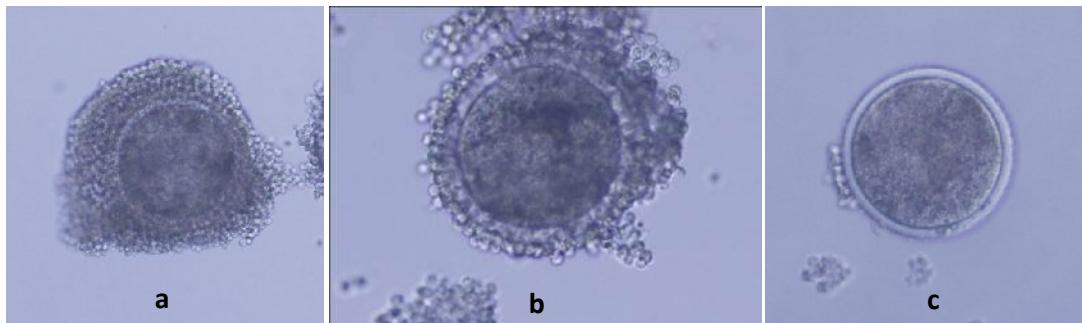
Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)



Gambar 4.3. Hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus

Pada diameter oosit kelompok 2 atau oosit berdiameter medium (160.5-170 μm), jumlah oosit dengan kualitas sel kumulus kategori baik sebanyak 61.02%, oosit dengan kualitas sel kumulus kategori sedang sebanyak 27.68%, dan oosit dengan kualitas sel kumulus kategori baik sebanyak 11.30%. Pada diameter oosit kelompok 3 atau oosit dengan diameter besar ($>170 \mu\text{m}$), jumlah oosit dengan kualitas sel kumulus kategori baik sebanyak 60.75%, oosit dengan kualitas sel kumulus kategori sedang sebanyak 28.04%, dan untuk oosit dengan kualitas sel kumulus kategori buruk sebanyak 11.21%. Jumlah

oosit dengan kualitas sel kumulus kategori baik, banyak ditemukan pada oosit berdiameter medium (160.5-170 μm) dan berdiameter besar ($>170 \mu\text{m}$), yaitu sebanyak 61.02% dan 60.75%, sedangkan untuk oosit dengan kualitas sel kumulus kategori buruk, banyak ditemukan pada oosit berdiameter kecil ($<160.5 \mu\text{m}$) yaitu sebanyak 36.21%.



Gambar 4.4. Kualitas sel kumulus pada oosit *immature*.

Keterangan: a) kualitas sel kumulus baik, b) kualitas sel kumulus sedang, c) kualitas sel kumulus buruk.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah oosit dengan kualitas sel kumulus baik banyak ditemukan pada oosit berdiameter medium (160.5-170 μm) dan oosit berdiameter besar ($>170 \mu\text{m}$). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan Sayuti *et al* (2007) yang menemukan kualitas sel kumulus oosit meningkat pada oosit berdiameter besar. Kondisi ini disebabkan karena bertambahnya jumlah lapisan sel kumulus (sel granulosa) yang mengelilingi oosit, berbanding lurus dengan pertumbuhan diameter oosit. Selama proses folikulogenesis dan oogenesis, sel granulosa yang berada mengelilingi sel oosit primer akan berproliferasi dari selapis sel kuboid, menjadi beberapa lapisan sel kolumnar dan terus bertambah selama perkembangan folikel dan oosit (Johnson dan Everitt, 2007). Keadaan ini menyebabkan oosit dengan diameter yang lebih besar memiliki kualitas sel kumulus yang lebih baik, karena jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilinginya lebih banyak bila dibandingkan dengan oosit berdiameter kecil. Perbedaan kualitas sel kumulus oosit yang diperoleh dalam aspirasi folikel selain dipengaruhi oleh ukuran diameter oosit (Sayuti *et al.*, 2007) dipengaruhi juga oleh kondisi fisiologis ovarium (Mondal *et al.*, 2008) dan mekanisme dalam koleksi oosit (Wang *et al.*, 2007). Menurut Mondal *et al* (2008) kualitas sel kumulus oosit dipengaruhi oleh kondisi fisiologis ovarium. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa jumlah oosit dengan kualitas sel kumulus baik (sel kumulus lebih dari 3 lapis) banyak ditemukan pada ovarium yang tidak memiliki corpus luteum. Penelitian yang dilakukan Wang *et al* (2007) menggunakan empat metode koleksi untuk mendapatkan oosit kambing boer menunjukkan

bahwa teknik koleksi yang digunakan dalam koleksi oosit mempengaruhi kualitas sel kumulus. Hasil penelitian yang dilakukan menggunakan teknik slicing, puncture, aspirasi I dan aspirasi II, menunjukkan bahwa dengan teknik slicing dan puncture, diperoleh lebih banyak oosit berkualitas baik (sel kumulus lebih dari 3 lapis).

Pentingnya sel kumulus yang ada pada oosit dikarenakan sel kumulus membentuk *gap junction* dengan permukaan oosit *immature* melalui zona pellusida. *Gap junction* ini terbentuk melalui peningkatan jumlah sel granulose yang berdekatan dan menyediakan dasar dalam terbentuknya jaringan komunikasi intraseluler (Johnson dan Everitt, 2007). Melalui *gap junction* yang terbentuk antara zona pellusida dan sel granulosa, asam amino dan *nukleotides* yang dibutuhkan dalam pertumbuhan oosit disalurkan, sehingga memperhatikan kualitas sel kumulus dalam pelaksanaan IVM sangat dianjurkan.

4.3 Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap kompetensi maturasi oosit.

4.3.1. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap ekspansi kumulus

Data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS) ditampilkan pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.6.

Tabel 4.3. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS)

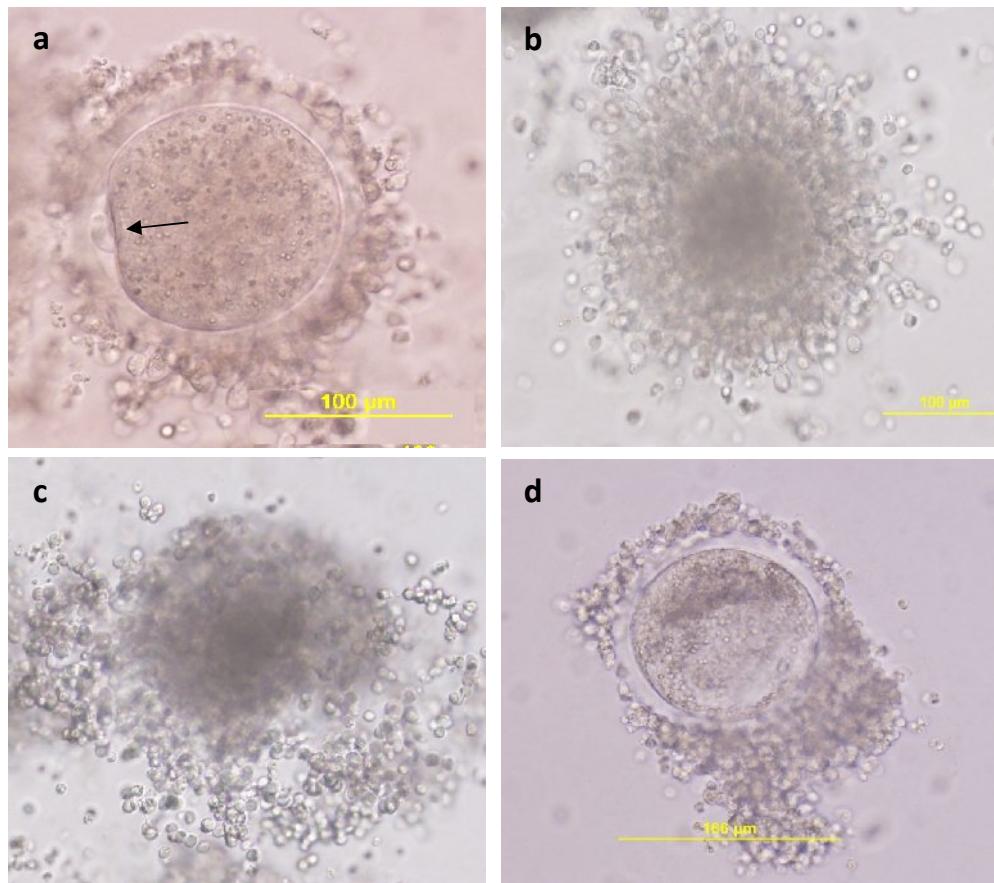
Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Kumulus		
		1	2	3
Kelompok 1 (<160.5 μm)	68	7.4 \pm 2.41 ^a (54.4%)	3.2 \pm 1.79 ^a (23.5%)	3 \pm 0.71 ^b (22.1%)
Kelompok 2 (160.5-170 μm)	90	13 \pm 1.22 ^b (72.2%)	3.4 \pm 1.34 ^a (18.9%)	1.6 \pm 0.55 ^a (8.9%)
Kelompok 3 (>170 μm)	78	10 \pm 2.129 ^a (64.1%)	3 \pm 1 ^a (19.2%)	2.6 \pm 1.14 ^{ab} (16.7%)

Keterangan: (1) ekspansi kumulus tingkat 1; (2) ekspansi kumulus tingkat 2; (3) ekspansi kumulus tingkat 3.

Nilai menunjukkan mean \pm sd dan persentase

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)

Hasil analisis tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS) menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat ekspansi kumulus ($p<0.05$). Analisis data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 dapat dilihat pada Lampiran 6. Tingkat ekspansi kumulus dilihat dari perenggangan sel granulosa yang mengelilingi oosit setelah dikultur selama 26 jam pada inkubator CO₂. Tingkat ekspansi kumulus dibedakan menjadi tiga kategori yaitu ekspansi kumulus tingkat 1, ekspansi kumulus tingkat 2, dan ekspansi kumulus tingkat 3.

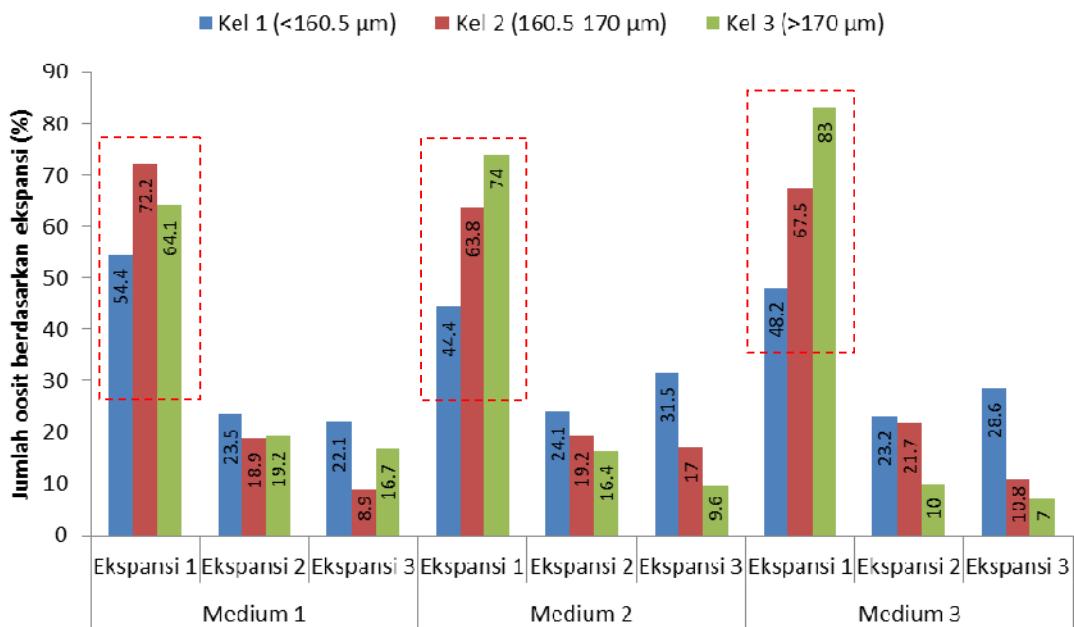


Gambar 4.5. Tingkat ekspansi sel kumulus dan polar bodi I setalah kultur 26 jam

Keterangan: a) polar bodi I, b) ekspansi kumulus tingkat 1, c) ekspansi kumulus tingkat 2, d) ekspansi kumulus tingkat 3.

Ekspansi kumulus tingkat 1 apabila sel kumulus terekspansi secara keseluruhan, ekspansi kumulus tingkat 2 apabila sel kumulus terekspansi sebagian, dan ekspansi kumulus tingkat 3 apabila sel kumulus tidak terekspansi (keadaan sel kumulus seperti sebelum dikultur). Perbandingan ekspansi kumulus tingkat 1, ekspansi kumulus tingkat 2, dan ekspansi kumulus tingkat 3 dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa ekspansi kumulus tingkat 1 pada medium 1 berbeda nyata antara kelompok diameter oosit dengan perbandingan antara kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), kelompok 2 ($160.5-170 \mu\text{m}$), dan kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) berturut-turut adalah 54.4%, 72.2% dan 64.1%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekspansi kumulus tingkat 1, ditemukan paling banyak pada diameter oosit kelompok 2 yaitu 72.2%, kemudian diikuti oleh diameter oosit diameter 3 dan diameter oosit kelompok 1 berturut-turut sebanyak 64.1% dan 54.4%. Persentase ekspansi kumulus tingkat 2 antara diameter oosit kelompok 1, kelompok 2 dan kelompok 3 berturut –turut adalah 23.5%, 18.9%, dan 19.2%.



Gambar 4.6. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel), medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel).

Keterangan: Garis merah putus-putus menunjukkan bahwa pada medium 1, medium 2 dan medium 3 jumlah oosit yang paling banyak mencapai ekspansi 1 adalah oosit *immature* yang termasuk dalam kelompok diameter 2, dan kelompok diameter 3.

Hasil tersebut seperti yang terlihat pada Tabel 4.3 bahwa tidak terdapat perbedaan persentase jumlah ekspansi kumulus tingkat 2 antara kelompok diameter oosit. Persentase ekspansi kumulus tingkat 3 pada diameter oosit kelompok 1, diameter oosit kelompok 2, dan diameter oosit kelompok 3 tidak terdapat perbedaan nyata, dengan persentase berturut-turut adalah 22.1%, 8.9%, dan 16.7%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa jumlah oosit yang tidak terekspansi (ekspansi 3) banyak terdapat pada diameter oosit kelompok 3.

Tabel 4.4. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel)

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Kumulus		
		1	2	3
Kelompok 1 (<160.5 μm)	54	4.8±0.84 ^a (44.4%)	2.6±0.55 ^a (24.1%)	3.4±0.55 ^b (31.5%)
Kelompok 2 (160.5-170 μm)	94	12±1.22 ^b (63.8%)	3.6±1.34 ^a (19.2%)	3.2±0.84 ^b (17%)
Kelompok 3 (>170 μm)	73	10.8±2.59 ^b (74%)	2.4±1.67 ^a (16.4%)	1.4±0.89 ^a (9.6%)

Keterangan: (1) ekspansi kumulus tingkat 1; (2) ekspansi kumulus tingkat 2; (3) ekspansi kumulus tingkat 3
Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)

Pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.6 menunjukkan data persentase tingkat ekspansi kumulus hasil kultur IVM selama 26 jam pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap ekspansi kumulus ($p<0.05$), khususnya pada ekspansi kumulus tingkat 1 dan tingkat 3. Hasil pada Tabel 4.4 menunjukkan nilai persentase ekspansi kumulus tingkat 1 pada diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), kelompok 2 (160.5-170 μm), dan kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) secara berturut-turut adalah 44.4%, 63.8%, dan 74%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) memiliki paling banyak oosit dengan ekspansi kumulus tingkat 1. Sementara itu persentase ekspansi 1 antara diameter oosit kelompok 2 dan diameter oosit kelompok 3 tidak berbeda nyata, yang menunjukkan bahwa oosit yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 2 dan 3 memiliki kesempatan yang sama untuk mencapai ekspansi kumulus tingkat 1. Analisis data Tabel 4.4 dapat dilihat pada Lampiran 7.

Perbandingan persentase ekspansi kumulus tingkat 2 pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel) pada diameter oosit kelompok 1, 2, dan 3 tidak berbeda nyata, dengan nilai berturut-turut yaitu 24.1%, 19.2%, dan 16.4%. Ekspansi kumulus tingkat 3 pada diameter oosit kelompok 1, kelompok 2, dan kelompok 3 secara berturut-turut adalah 31.5%, 17%, dan 9.6%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa oosit yang termasuk diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$) memiliki kemungkinan tidak terekspansi paling tinggi yaitu 31.5%, dan dapat dilihat bahwa nilai persentase diameter oosit kelompok 1 dan kelompok 2 pada ekspansi kumulus tingkat 3 tidak berbeda nyata (31.5% dan 17%) namun berbeda nyata bila dibandingkan dengan nilai persentase diameter oosit kelompok 3 (9.6%). Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa oosit yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) paling sedikit yang memiliki ekspansi kumulus tingkat 3.

Tabel 4.5. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel)

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Kumulus		
		1	2	3
Kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$)	56	5.4±0.89 ^a (48.2%)	2.6±1.52 ^{ab} (23.2%)	3.2±1.1 ^b (28.6%)
Kelompok 2 (160.5-170 μm)	83	11.2±2.59 ^b (67.5%)	3.6±0.89 ^b (21.7%)	1.8±0.84 ^a (10.8%)
Kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$)	71	11.8±2.59 ^b (83%)	1.4±1.14 ^a (10%)	1±0.71 ^a (7%)

Keterangan: (1) ekspansi tingkat 1; (2) ekspansi tingkat 2; (3) ekspansi tingkat 3
Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase. Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)

Tabel 4.5 dan Gambar 4.6 menunjukkan perbandingan nilai persentase ekspansi kumulus tingkat 1, ekspansi kumulus tingkat 2 dan ekspansi kumulus tingkat 3 pada oosit *immature* yang dikultur pada medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel). Analisis data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium TCM-199 + 15% cairan folikel dapat dilihat pada Lampiran 8.

Hasil analisis tingkat ekspansi sel kumulus pada medium 3 menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat ekspansi kumulus ($p<0.05$), khususnya pada ekspansi kumulus tingkat 1 dan ekspansi kumulus tingkat 3. Perbandingan nilai persentase ekspansi kumulus tingkat 1 pada diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), diameter oosit kelompok 2 ($160.5-170 \mu\text{m}$), dan diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) berturut-turut adalah 48.2%, 67.5%, dan 83%. Hasil ini menunjukkan bahwa diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) memiliki paling banyak oosit yang terekspansi sempurna (ekspansi tingkat 1), namun tidak berbeda nyata dengan diameter oosit kelompok 2. Artinya oosit yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 2 dan kelompok diameter 3 memiliki kemampuan yang tidak berbeda dalam mencapai ekspansi kumulus tingkat 1. Perbandingan persentase ekspansi kumulus tingkat 2 pada diameter oosit kelompok 1, kelompok 2, dan kelompok 3 tidak berbeda nyata dengan nilai berturut-turut adalah 23.2%, 21.7%, dan 10%. Persentase ekspansi kumulus tingkat 3 pada diameter oosit kelompok 1, kelompok 2, dan kelompok 3 berturut-turut adalah 28.6%, 10.8%, dan 7%. Hasil ini menunjukkan bahwa diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$) memiliki banyak oosit yang masuk dalam kategori ekspansi kumulus tingkat 3 (tidak terekspansi) yaitu sebanyak 28.6%, sedangkan diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) memiliki oosit yang tidak terekspansi (ekspansi kumulus tingkat 3) paling sedikit yaitu sebesar 7%.

Hasil kultur IVM untuk melihat pengaruh diameter oosit *immature* terhadap ekspansi kumulus menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh nyata terhadap tingkat ekspansi kumulus ($p<0.05$), terutama pada ekspansi kumulus tingkat 1. Gambar 4.6 menunjukkan bahwa pada semua medium yang digunakan, diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) memiliki oosit dengan ekspansi kumulus tingkat 1 paling banyak, kecuali pada medium 1 dan diikuti oleh diameter oosit kelompok 2 ($160.5-170 \mu\text{m}$). Nilai persentase ekspansi kumulus tingkat 1 dari kelompok 2 ($160.5-170 \mu\text{m}$) pada medium 1, medium 2, dan medium 3 secara berturut-turut yaitu 72.2%, 63.8%, dan 67.5%. Nilai persentase ekspansi kumulus tingkat 1 dari kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) pada medium 1, medium 2, dan medium 3 secara berturut-turut yaitu 64.1%, 74%, dan 83.5%. Sementara itu jumlah oosit *immature* yang tidak mengalami ekspansi sel granulosa (ekspansi kumulus

tingkat 3), banyak ditemukan pada kelompok diameter 1 ($<160.5\text{ }\mu\text{m}$) yaitu 22.1% pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), 31.5% pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel) dan 28.6% pada medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel). Hasil ini menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat ekspansi kumulus.

Pentingnya mengamati kriteria tingkat ekspansi sel kumulus pada kultur IVM dikarenakan mengamati maturasi oosit hasil kultur IVM dapat diketahui dari perkembangan (ekspansi) sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit (Gambar 4.5). Menurut Rahman *et al* (2008) tingkat ekspansi sel kumulus dapat digunakan sebagai indikator bahwa oosit telah memasuki tahap M-II. Ekspansi sel kumulus penting dalam mendukung proses maturasi. Hal ini dikarenakan sel kumulus berperan sebagai *gap junction* yang berperan dalam transfer nutrisi dan faktor lainnya yang mendukung dalam perkembangan oosit. Menurut Lapthitis *et al* (2002), sel kumulus mendukung proses pematangan oosit sampai M-II. Sel kumulus juga diketahui membantu sistesis protein untuk membentuk zona pelusida pada tahap profase (Schroeter dan Meinecke, 1995) dan berfungsi menghambat pengerasan zona pelusida sehingga proses fertilisasi dapat terjadi (Boediono dan Suzuki, 1996). Selain tingkat ekspansi kumulus, penanda bahwa oosit telah *mature* dapat dilihat dari terdapatnya polar bodi pertama (PB I) pada oosit yang telah dikultur. Keberadaan PB I (Gambar 4.5a) menunjukkan bahwa oosit telah memasuki tahap metafase II (Gordon, 1994). Kedua kriteria tersebut (ekspansi sel kumulus dan PB I) menggambarkan bahwa oosit telah mengalami maturasi cukup banyak, hal ini dinyatakan oleh Gordon (1994) bahwa polar bodi pada mamalia hanya dapat diamati rata-rata 50% namun hal ini bukan berarti oosit tersebut tidak *mature*.

Hasil penelitian pengaruh diameter oosit *immature* terhadap ekspansi kumulus menunjukkan bahwa semakin besar diameter oosit *immature*, akan menghasilkan oosit dengan ekspansi kumulus tingkat 1 (ekspansi sempurna) lebih banyak. Keadaan ini menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berhubungan dengan kemampuan oosit untuk berkembang dari fase germinal vesicle (GV) menuju metafase II (M-II). Keadaan ini dikarenakan oosit yang telah mencapai pertumbuhan diameter yang maksimal, telah memiliki kemampuan perkembangan yang sempurna, yang meliputi matangnya kondisi fisiologi nukleus dan sitoplasma yang diketahui berpengaruh dalam kemampuan oosit untuk berkembang dari fase GV menuju fase M-II. Berdasarkan hal tersebut, oosit *immature* berdiameter besar memiliki kesempatan yang lebih tinggi untuk mencapai tahap M-II bila dibandingkan dengan oosit *immature* berdiameter kecil.

4.3.2. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti

Pengamatan tingkat maturasi inti dilakukan dengan pembuatan preparat dengan pewarnaan aceto orcein 1%. Tingkat maturasi inti yang diamati terdiri dari germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metafase I (MI), dan metafase II (MII) (Gambar 4.8). Data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS) ditampilkan pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.7.

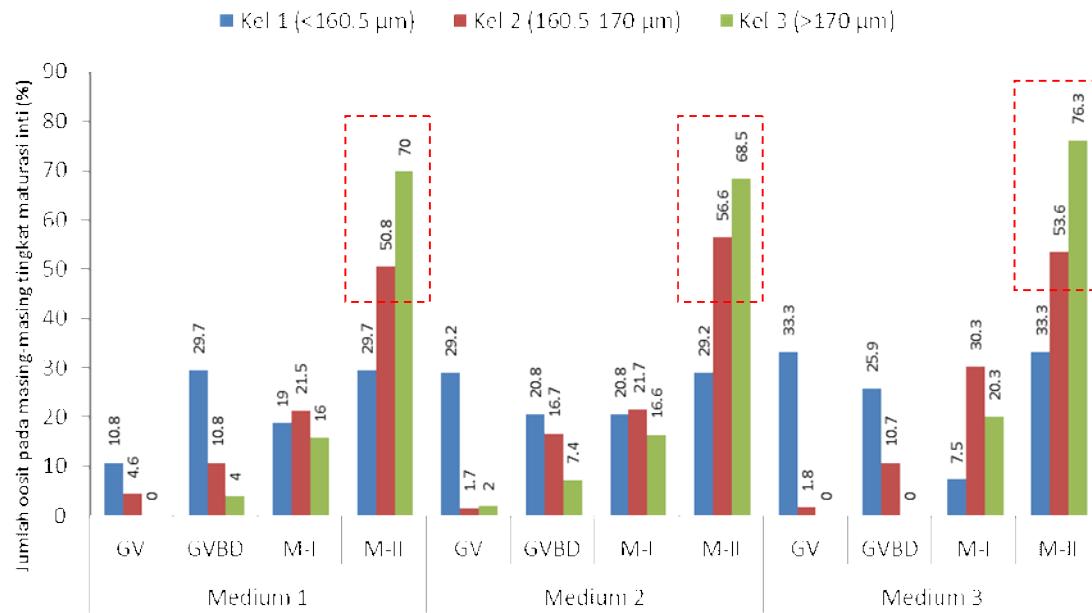
Tabel 4.6. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS)

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Maturasi Inti				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
Kelompok 1 (<160.5 µm)	37	0.8±0.84 ^a (10.8%)	2.2±1.1 ^b (29.7%)	1.4±0.55 ^a (19%)	2.2±1.3 ^a (29.7%)	0.8±0.84 (10.8%)
Kelompok 2 (160.5-170 µm)	65	0.6±0.55 ^a (4.6%)	1.4±0.55 ^{ab} (10.8%)	2.8±0.84 ^b (21.5%)	6.6±0.89 ^b (50.8%)	1.6±0.55 (12.3%)
Kelompok 3 (>170 µm)	50	0±0 ^a (0%)	0.4±0.55 ^a (4%)	1.6±1.14 ^{ab} (16%)	7±1.58 ^b (70%)	1±0.71 (10%)

Keterangan: GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; M-I: metafase I; M-II: metafase II; TI: tidak teridentifikasi. Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase. Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)

Hasil analisis data pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$). Perbandingan persentase diameter oosit kelompok 1 (<160.5 µm), kelompok 2 (160.5-170 µm), dan kelompok 3 (>170 µm) yang mencapai MII pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS) berbeda secara nyata dengan nilai berturut-turut adalah 29.7%, 50.8%, dan 70%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa oosit *immature* yang tergolong dalam diameter oosit kelompok 3 memiliki jumlah oosit paling banyak mencapai metafase II (70%), diikuti diameter oosit kelompok 2 (50.8%) dan diameter oosit kelompok 1 (29.7%). Berdasarkan Tabel 4.6 menunjukkan bahwa oosit *immature* yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 1 banyak tertahan/berada pada fase *germinal vesicle* (GV) dan *germinal vesicle break down* (GVBD) yaitu 10.8% dan 29.7% dengan persentase yang mencapai metafase II (MII) sebanyak 29.7%. Hal ini menunjukkan bahwa oosit dengan diameter <160.5 µm banyak yang belum memiliki kompetensi perkembangan sampai pada fase metafase II. Sementara itu persentase tertinggi pada fase metafase I (MI) dimiliki oleh diameter oosit kelompok 2 sebanyak 21.5% dengan persentase yang mencapai MII sebanyak 50.8%. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar oosit pada kelompok 2 (160.5-170 µm) sudah memiliki kompetensi

perkembangan yang dibutuhkan sampai mencapai MII. Nilai TI (tidak teridentifikasi) merupakan nilai yang diperoleh dari jumlah oosit *mature* yang tidak dapat teridentifikasi yang disebabkan karena hilang atau pecah saat proses pewarnaan aceto orcein. Analisis data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 dapat dilihat di Lampiran 9.



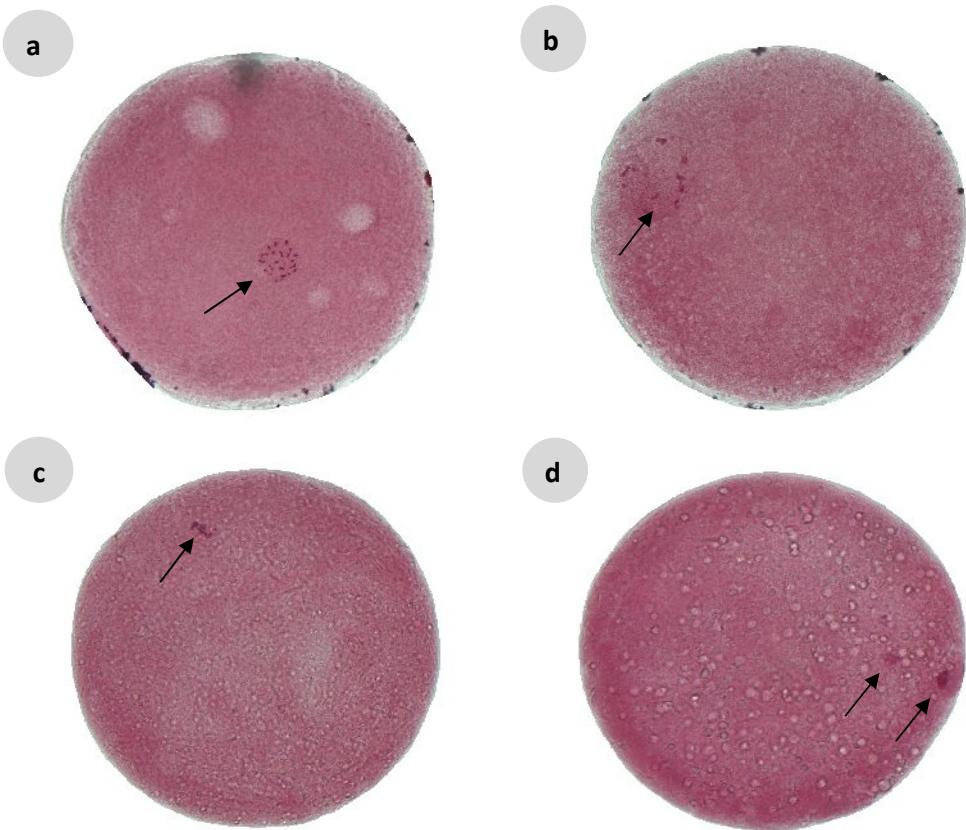
Gambar 4.7. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel), medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel).

Keterangan: Garis merah putus-putus menunjukkan bahwa pada medium 1, 2 dan medium 3 jumlah oosit yang paling banyak mencapai metafase II adalah oosit *immature* yang termasuk dalam kelompok diameter 2, dan kelompok diameter 3.

Tabel 4.7. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan folikel)

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Maturasi Inti				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
Kelompok 1 (<160.5 μm)	24	1.4±0.89 ^b (29.2%)	1±1 ^a (20.8%)	1±1 ^a (20.8%)	1.4±1.14 ^a (29.2%)	0±0 (0%)
Kelompok 2 (160.5-170 μm)	60	0.2±0.45 ^a (1.7%)	2±1 ^a (16.7%)	2.6±0.89 ^b (21.7%)	6.8±1.1 ^b (56.6%)	0.4±0.55 (3.3%)
Kelompok 3 (>170 μm)	54	0.2±0.45 ^a (2%)	0.8±0.84 ^a (7.4%)	1.8±1.1 ^{ab} (16.6%)	7.4±1.67 ^b (68.5%)	0.6±0.55 (5.5%)

Keterangan: GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; M-I: metafase I; M-II: metafase II; TI: tidak teridentifikasi. Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase. Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)



Gambar 4.8. Maturasi inti dengan pewarnaan aceto orcein 1%

Keterangan: a) germinal vesicle (GV), b) germinal vesicle break down (GVBD),
c) metafase I (M-I), d) metafase II (M-II)

Hasil analisis data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel) yang ditampilkan pada Tabel 4.7 dan Gambar 4.7 menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$), khususnya pada metafase II. Persentase diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), diameter oosit kelompok 2 (160.5-170 μm), dan diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) yang mencapai MII pada medium 2 berbeda secara nyata dengan nilai berturut-turut adalah 29.2%, 56.6%, dan 68.5%. Hasil ini menunjukkan bahwa oosit *immature* yang termasuk dalam kelompok diameter 3 paling banyak mencapai metafase II (68.5%), yang diikuti oleh diameter oosit kelompok 2 (56.6%). Nilai persentase tertinggi pada fase GV dan GVBD dimiliki oleh diameter oosit kelompok 1 yaitu sebesar 29.2% dan 20.8%. Hal ini menunjukkan bahwa banyak oosit *immature* yang termasuk pada diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$) belum memiliki kompetensi perkembangan untuk mencapai fase MII. Sementara itu untuk diameter oosit kelompok 2, meskipun persentase jumlah oosit *immature* yang mencapai metafase II sebanyak 56.6%, namun jumlah persentase yang

berada pada fase metaphase I cukup tinggi sebanyak 21.7%. Hal ini mengindikasikan bahwa sebagian besar dari oosit *immature* yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 2 sudah memiliki kompetensi perkembangan untuk mencapai fase MII. Sementara itu untuk jumlah oosit yang tidak teridentifikasi (TI), pada perlakuan medium 2 sudah berkurang bila dibandingkan dengan perlakuan pada medium 1, hal ini diduga karena pada pewarnaan aceto orcein pada medium 2 ini peneliti lebih menguasai teknik yang digunakan sehingga memperkecil tingkat kerusakan pada sel yang diwarnai. Analisis data pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 dapat dilihat di Lampiran 10.

Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan folikel) dapat diikuti pada Tabel 4.8 dan Gambar 4.7

Tabel 4.8. Pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan folikel)

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Maturasi Inti				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
Kelompok 1 (<160.5 µm)	27	1.8±0.84 ^b (33.3%)	1.4±0.89 ^b (25.9%)	0.4±0.55 ^a (7.5%)	1.8±0.84 ^a (33.3%)	0±0 (0%)
Kelompok 2 (160.5-170 µm)	56	0.2±0.45 ^a (1.8%)	1.2±0.84 ^b (10.7%)	3.4±0.89 ^c (30.3%)	6±1.22 ^b (53.6%)	0.4±0.55 (3.6%)
Kelompok 3 (>170 µm)	59	0±0 ^a (0%)	0±0 ^a (0%)	2.4±0.55 ^b (20.3%)	9±2.12 ^c (76.3%)	0.4±0.55 (3.4%)

Keterangan: GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; M-I: metaphase I;

M-II: metaphase II; TI: tidak teridentifikasi. Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0.05$)

Hasil analisis pada Tabel 4.8 menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$). Nilai persentase diameter oosit kelompok 1 ($<160.5 \mu\text{m}$), diameter oosit kelompok 2 (160.5-170 μm), dan diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) berbeda secara nyata ($p<0.05$) dengan nilai berturut-turut adalah 33.3%, 53.6% dan 76.3%. Hasil ini menunjukkan bahwa oosit *immature* yang tergolong dalam diameter oosit kelompok 3 memiliki jumlah paling banyak mencapai metaphase II (76.3%) bila dibandingkan dengan oosit *immature* yang berasal dari diameter oosit kelompok 2 (53.6%) dan kelompok diameter 1 (33.3%). Hasil ini menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatkan ukuran diameter oosit, akan mempengaruhi kompetensi perkembangan yang dimiliki oleh oosit tersebut. Pada fase GV dan GVBD pada Tabel 4.8 dapat dilihat bahwa oosit *immature* yang termasuk dalam diameter oosit kelompok 1 memiliki persentase tertinggi yaitu 33.3% dan 25.9%. Hal ini mengindikasikan bahwa

kelompok diameter 1 banyak yang tidak dapat melanjutkan proses maturasi inti sampai fase metaphase II karena belum memiliki kompetensi perkembangan untuk mencapai fase MII. Sementara itu oosit *immature* yang masuk dalam kelompok diameter 2, cukup banyak yang tertahan atau hanya sampai pada MI dengan persentase sebesar 30.3%.

Hasil pengamatan terhadap tingkat maturasi inti yang dilakukan pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS), medium 2 (TCM-199 + 10 Cairan folikel) dan medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan folikel) menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$) (Gambar 4.7). Berdasarkan data yang diperoleh pada ketiga medium menunjukkan bahwa diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) merupakan kelompok diameter oosit *immature* yang memiliki tingkat persentase paling tinggi pada tahap metaphase II yaitu 70% pada medium 1, 68.5% pada medium 2 dan 76.3% pada medium 3. Sementara itu persentase diameter oosit kelompok 2 (160.5-170 μm) tidak berbeda nyata dengan diameter oosit kelompok 3, dimana persentase pada tahap MII adalah 50.8% pada medium 1, 56.6 % pada medium 2, dan 53.6% pada medium 3.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa diameter oosit *immature* berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit, baik itu pada ekspansi kumulus maupun pada tingkat maturasi inti ($p<0.05$). Hasil yang diperoleh juga menunjukkan bahwa kelompok diameter 3 ($>170 \mu\text{m}$) dan kelompok diameter 2 (160.5-170 μm) merupakan kelompok diameter yang paling banyak mencapai tahap ekspansi kumulus 1 dan tahap metaphase II. Hasil dalam penelitian ini tidak jauh berbeda dengan yang diperoleh oleh Lucas *et al* (2002) pada babi, Khatir *et al* (2007) pada unta, dan Evecen *et al* (2010) pada anjing yang mendapatkan bahwa oosit dengan diameter yang lebih besar berpengaruh baik terhadap kompetensi perkembangan oosit dan terdapat hubungan antara oosit diameter dengan kompetensi perkembangan.. Seperti yang telah diketahui bahwa oosit sebelum masa pubertas dari individu betina tertahan pada fase *germinal vesicle* (GV) yaitu pada profase I diploten. Agar dapat melanjutkan tahapan meiosis dari GV menuju M-II, oosit harus memiliki kompetensi perkembangan secara maksimal (Ledda *et al.*,1999). Untuk dapat mendapatkan kemampuan perkembangan yang maksimal, oosit harus menyelesaikan tahapan-tahapan sintesis pada nukleus dan sitoplasma. Pada proses *resuming* GV menuju M-II, banyak proses perubahan intraseluler yang dibutuhkan oleh sitoplasma seperti distribusi organel dan sintesis protein pada fase yang berbeda pada tahapan meiosis (Johnson dan Everitt, 2007; Kastrop *et al.*, 1990). Hyttel *et al* (1997) menunjukkan bahwa terdapat hubungan langsung antara *oocyte dimension* dan *meiotic developmental competence*. Johnson dan Everitt (2007) menyebutkan bahwa pertambahan ukuran

diameter oosit disebabkan karena adanya proses sintesis ribosom dan mRNA dalam jumlah besar dimana ribosom dan mRNA diperlukan untuk fase selanjutnya dalam maturasi oosit dan fase perkembangan setelah fertilisasi oosit.

Kemampuan oosit *immature* untuk mencapai tahap metafase II dipengaruhi oleh stimulasi hormon, namun dibutuhkan juga kompetensi perkembangan yang dipengaruhi oleh kesiapan kondisi fisiologi sitoplasma dan nukleus dari oosit. Kesiapan kondisi fisiologis sitoplasma dalam mendukung maturasi oosit mencapai metafase II dapat dilihat dari ukuran diameter yang dimiliki. Hal ini dikarenakan selama proses folikulogenesis dan oogenesis, oosit mengalami pertambahan ukuran diameter yang disebabkan adanya sintesis ribosom dan mRNA dalam jumlah besar. Pertambahan ukuran diameter oosit disebabkan juga karena adanya akumulasi air, ion, karbohidrat, lipid (Fair *et al.*, 1997) dan meningkatnya jumlah organel dan akumulasi mRNA (Hyttel *et al.*, 1997). Ledda *et al* (1999) dan Evecen *et al* (2010) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara diameter oosit dengan kompetensi perkembangan oosit mencapai maturasi (metafase II). Diketahui juga berdasarkan hasil penelitian Lucas *et al* (2002) pada babi, menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara ukuran diameter oosit dengan tingkat maturasi inti. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar ukuran diameter oosit, akan meningkatkan kompetensi perkembangan oosit untuk mencapai tahap metafase II. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa diameter oosit dapat digunakan sebagai kriteria seleksi oosit *immature* untuk keperluan IVM (Lucas *et al.*, 2002; Evecen *et al.*, 2010).

4.4 Pengaruh jenis medium terhadap kompetensi maturasi oosit

Data hasil pengaruh jenis medium terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit yang meliputi ekspansi kumulus dan tingkat maturasi oosit ditampilkan pada Tabel 4.9 dan 4.10.

Tabel 4.9. Pengaruh jenis medium terhadap tingkat ekspansi kumulus

Jenis Medium	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Sel Kumulus		
		1	2	3
TCM-199 + 10% FBS	236	30.4±3.65 (64.4%)	9.6±2.79 (20.3%)	7.2±1.79 (15.3%)
TCM-199 + 10% CF	221	27.6±2.61 (62.4%)	8.6±2.88 (19.5%)	8±1.22 (19.1%)
TCM-199 + 15% CF	210	28.4±5.13 (67.6%)	7.6±3.36 (18.1%)	6±1.41 (14.3%)

Keterangan: (1) ekspansi tingkat 1; (2) ekspansi tingkat 2; (3) ekspansi tingkat 3

Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase

Tabel 4.10. Pengaruh jenis medium terhadap tingkat maturasi inti

Jenis Medium	Jumlah Oosit	Tingkat Maturasi Inti				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
TCM-199 + 10% FBS	152	1.4±0.89 (4.6%)	4±1.4 (13.2%)	5.8±1.64 (19.1%)	15.8±2.59 (51.9%)	3.4±1.52 (4.6%)
TCM-199 + 10% CF	138	1.8±1.3 (6.5%)	3.8±1.64 (13.8%)	5.4±2.3 (19.6%)	15.6±1.34 (56.5%)	1±1 (0.03%)
TCM-199 + 15% CF	142	2±1.22 (7.04%)	2.6±1.14 (9.2%)	6.2±0.84 (21.8%)	16.8±3.4 (59.2%)	0.8±0.84 (2.8%)

Keterangan: GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; M-I: metafase I; M-II: metafase II; TI: tidak teridentifikasi. Nilai menunjukkan mean±sd dan persentase

Hasil menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara pemberian medium kontrol dengan pemberian suplementasi cairan folikel ($p>0.05$). Hasil ini menunjukkan bahwa suplementasi cairan folikel yang diberikan pada medium in vitro maturasi (medium 2 dan medium 3) memberikan hasil baik (sama) bila dibandingkan hasil pada medium 1 yang menggunakan suplementasi FBS. Data ekspansi kumulus pada ekspansi kumulus tingkat 1 (terekspansi sempurna) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS) sebesar 64.4% bila dibandingkan dengan hasil pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan folikel) dan medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel) yaitu sebesar 62.4% dan 67.6%.

Hasil pengaruh medium terhadap tingkat maturasi inti menunjukkan bahwa pada medium 1, didapatkan oosit yang mencapai fase M-II sebanyak 51.9%. Hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan jumlah oosit yang mencapai tahapan M-II pada medium 2 dan medium 3 yaitu sebanyak 56.5% dan 59.2%.

Penggunaan suplementasi cairan folikel (CF) pada medium diharapkan dapat memberikan hasil yang sama baiknya (tidak berbeda) apabila dibandingkan dengan penggunaan suplementasi hormon atau serum buatan industri yang biasa digunakan untuk meningkatkan hasil maturasi pada proses IVM. Hasil ekspansi kumulus dan maturasi inti pada medium yang diberikan suplementasi cairan folikel menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p>0.05$) dengan oosit hasil IVM pada medium 1 yang disuplementasi dengan FBS buatan industri.

Pada Tabel 4.9 dan 4.10 dapat dilihat perbandingan kompetensi perkembangan oosit *immature* pada tiga jenis medium yang digunakan. Hasil tingkat maturasi (MII) yang diperoleh pada suplementasi cairan folikel 10% dan 15% pada medium IVM menunjukkan bahwa cairan folikel dapat digunakan sebagai suplementasi medium dalam proses IVM.

Sebelumnya diketahui bahwa cairan folikel menunjang pertumbuhan oosit dalam kondisi *in vivo* karena terdiri dari hormon, protein, dan *growth factor* lainnya yang menunjang oosit mencapai maturasi (Knight *et al.*, 1996). Penelitian yang telah dilakukan dalam pengidentifikasiannya kandungan dari cairan folikel menunjukkan bahwa cairan folikel mengandung beragam *growth factor*, *follicle stimulating hormone* (FSH), *luteinizing hormone* (LH), estradiol, dan beberapa protein lainnya (ERK2, p90rsk) yang mendukung dalam proses maturasi oosit (Avery *et al.*, 2003; Deshpande dan Pathak, 2010; Wahjuningsih dan Djati, 2012).

Penggunaan cairan folikel sebagai pengganti serum dengan tujuan untuk meningkatkan efisiensi maturasi oosit secara *in vitro* menunjukkan hasil yang memuaskan, karena di dalam cairan folikel terdapat sekresi folikuler yang mendukung maturasi oosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cairan folikel berhasil digunakan sebagai media suplemen dalam medium IVM pada sapi (Alia *et al.*, 2004), pada babi (Ito *et al.*, 2008), pada kerbau (Nandi *et al.*, 2004), dan pada kambing (Cognie *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2012).

Keberhasilan cairan folikel digunakan sebagai media suplementasi medium IVM, dikarenakan cairan folikel memainkan peranan penting dalam folikulogenesis, maturasi oosit, ekspansi sel granulosa, luteinisasi dan ovulasi (Aquila *et al.*, 2001). Beberapa studi menunjukkan bahwa cairan folikel merupakan medium mampu untuk stimulasi lingkungan alami pada maturasi oosit (Haque *et al.*, 2012; Bogh *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2001). Peneliti lain juga menyebutkan bahwa cairan folikel merupakan kondisi yang menguntungkan untuk sel granulosa (Lin *et al.*, 2002) dan sel endometrial dengan cara merangsang maturasi, pertumbuhan dan proliferasi sel-sel tersebut secara *in vitro* (Heikinheimo dan Gibbons, 1998).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Diameter oosit *immature* berpengaruh signifikan terhadap ekspansi kumulus dan tingkat maturasi oosit. Diameter oosit kelompok 3 ($>170 \mu\text{m}$) memiliki jumlah oosit terbanyak mencapai ekspansi kumulus tingkat 1 dan fase metafase II.
2. Suplementasi cairan folikel 10% dan 15% pada medium IVM memberikan pengaruh baik terhadap kompetensi perkembangan oosit, dan suplementasi cairan folikel dapat digunakan sebagai suplemen medium IVM. Suplementasi 15% cairan folikel memberikan hasil ekspansi dan maturasi oosit paling baik tetapi tidak berbeda signifikan dengan suplementasi 10%.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan diameter oosit terhadap kompetensi perkembangan maturasi oosit, terutama untuk melihat aktivitas sintesis protein dalam ukuran diameter berbeda.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan hormon dan protein cairan folikel pada ukuran folikel berbeda dan pemanfaatan cairan folikel sebagai bahan suplementasi medium IVM.

DAFTAR PUSTAKA

- Adifa, N.S. 2009. Pengaruh penambahan *chorionic gonadotrophin* pada medium maturasi terhadap kemampuan maturasi, fertilisasi, dan perkembangan embrio secara *in vitro* kambing peranakan etawa. Fakultas Peternakan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Agus, S.M. dan Supriatna, I. 2010. Seleksi kemampuan pematangan oosit domba menggunakan teknik brilliant cressyl blue. *Jurnal Veteriner* Vol.11 No.4:251-256.
- Alia, A., Coenena, K., Daniel, B. dan Marc-Andre, S. 2004. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 62, 1596-1606.
- Amstrong, D.T. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55: 1303-1322.
- Anwar, R. 2005. Morfologi dan Fungsi Ovarium. Subbagian fertilitas dan endokrinologi reproduksi. Fakultas Kedokteran Unpad. Bandung.
- Aquilar, J.J., Woods, G.L., Miragaya, M.H., Olsen, L.M. dan Vanderwall, D.K. 2001. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 56 745-758.
- Arlotto, T., Schwartz, J.L., First N.L. dan Leibfried-Rutledge, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45, 943-956
- Avery, B., Strobech, L., Jacobsen, T., Bogh, I.B. dan Greve, T. 2003. *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid, effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*. 59, 987-999.
- Bavister, B.D., Hallakent, R. dan Pinyopumminter, T. 1992. Development of matured *in vitro* fertilized bovine embryo into morulae and blastocysts. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Boediono, A dan Damayanti, T. 1996. Dari limbah rumah potong hewan bisa dihasilkan anak sapi. *Spektrum* 10: 32-33.
- Boediono, A dan Suzuki, T. 1996. *In Vitro* development of Holstein and Japanese black breeds embryo. *Media Veteriner* 3: 3-9.
- Boediono, A., Rusiyantono, Y., Mohamad, K., Djuwita, I. dan Sukra, Y. 1999. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner.

- Bogh, I.B., Beard, J., Duchamp, G., Baltsen, M., Gerald, N., Daels, P. dan Greve, T. 2002. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vitro aspirated equine oocyte. *Theriogenology* 57: 1765-1779.
- Catala, M.G. 2012. Assessment of prepubertal sheep oocyte competence for *in vitro* embryo production by the *Brilliant Cresyl Blue* test. Doctoral Thesis. Universitas Autonoma de Barcelona.
- Ciptadi, G., Siswanto, B., Rahayu, S., Fadli, M.Z. dan Humaidah, N. 2011. Review fisibilitas kultur anthral folikel sebagai sumber sel oosit *in vitro* kambing dari produk samping rumah potong hewan. *J.Ternak Tropika* Vol.12, No.2:83-90.
- Cognie, Y., Benoit, F., Poulin, N., Khatir, H. dan Driancourt, M.A. 1998. Effect of follicle size and of the *Fec^B* Boorola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fert.* 112: 379-386.
- Cognie, Y., Poulin, N., Locatelli, Y. dan Mermilliod, P. 2004. State of the art production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 437-445.
- Collado-Fernandez, E., Picton, H.M. dan Dumollard, R. 2012. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 799-808.
- Crozet, N., Ahmed, A.M. dan Dubos, P. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Reprod. Fert* 76: 31-37.
- Day, B.N. dan Funahashi, H. 1996. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. American Society of Animal Science, p. 125-44.
- Deshpande, S.B. dan Pathak, M.M. 2010. Hormonal and biochemical profiles in follicular fluid of unovulated follicles in superovulated goats ovaries. *Veterinary World*. Vol.3 (5):221-223.
- Erickson, G.F. Follicle Growth and Development. Dikutip dari <http://www.glowm.com/resources/glowm/cd/pages/v5/v5c012.html>. pada tanggal 6 April.
- Evecen, M., Cirit, U., Demir, K., Karaman, E., Bakirer, G., Hamzaoglu, A.I., Birler, S. dan Pabuccuoglu, S. 2010. Effect of oocyte diameter on *in vitro* embryo production in dogs. *Research Article* 16 (6): 947-950.
- Fair, T., Hulshof, S.C.J., Hyttel, P. dan Greve, T. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryo* 195: 327-336.
- Findlay, J.K., Drummond, A.E. dan Fry, R.C. 1996. Intragonal regulation of follicular development and ovulation. *Anim. Reprod. Sci* 42: 321-331.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Yogyakarta: Gadjah Mada Univ. Terjemahan dari: Anatomy and Physiology of Farm Animal. pp: 599-735.

- Ginther, O.J., Kot, K., Kulick, L.J. dan Wiltbank, M.C. 1997. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: Oestradiol concentration early in follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109 (1):181-186.
- Gordon, I. 1994. **Laboratory production of cattle embryos**. Department of Animal Science and Production. University College. Dublin. Ireland.
- Gotto, K, T. Yasuyuki, T. Wartaru, T. Shinichiro, T. Kazuhisa, Y. Kichi, Syojo dan Yoshihiki, N. 1995. Evaluation of once-versus twice weekly transvaginal ultrasound guided follicular oocyte aspiration with or without FSH stimulation from the same cows. *J. Anim. Reprod. Sci* 4: 41
- Griffin, J., Emery, B.R., Huang, I., Peterson, C.M. dan Carrell, D.T. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*. doi:10.1186/1743-1050-3-2.
- Gustari, S., Kurniani, N.W., Karja., Rizky, Amelia, Y., Kurniawan I. dan Sulistyo, B. 2009. In vitro maturation rate of goat oocytes in media supplemented with serum and albumin. *Jurnal Veteriner* Vol. 10 No. 4: 194-197.
- Guthrie, H. D., Grimes, R.W. dan Hammond, J.M. 1995. Changes in insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 in follicular fluid during atresia of follicles growth after ovulation in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104(1):225-230.
- Hafez, B. dan Hafez, E.S.E. 2000. **Reproduction in Farm Animals**. 7th ed. Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia
- Haque, S.A.M., Kabiraj, S.K., Khandoker, M.A.M.Y., Mondal, M.A. dan Tareq, K.M.A. 2011. Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *African Journal of Biotechnology*. 10: 9177-9181.
- Haque, S.A.M., Khandoker, M.A.M.Y., Kabiraj, S.K., Asad, L.Y., Fakruzzaman, M. dan Tareq, K.M.A. 2012. Effect of goat follicular fluid *in vitro* production of embryos in Black Bengal Goats. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 2(3), 287-294.
- Hardjopranjoto, S. 1995. **Ilmu Kemajiran Pada Ternak**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Heikinheimo, O. dan Gibbons, W. 1998. The molecular mechanism of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproduction medicine. *J. Molecular Human Reproduction*. 4: 745-756.
- Heleil, B. dan Fayed, M. 2010. Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by brilliant cresyl blue staining. *Global Veterinaria* 4:176-184.

- Hua, Z.D., Zheng, X.M., Wei, Q.X., Xu, H.Q., Wang, Y.G., Liu, X.M., Li, L., Xiao, H.W. dan Qiao, X.F. 2011. Effect of cumulus-oocyte complexes (COCs) culture duration on *in vitro* maturation and parthenogenetic development of pig oocyte. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(5), pp.867-873.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. dan Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturaration in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.
- Isobe, N. dan Terada, T. 2001. Effect of bovine follicular fluid added to the maturation medium on sperm penetration in pig oocytes matured in vitro. *Journal of International Development and Cooperation* Vol.7, No.1, 59–66.
- Ito, M., Iwata, H., Kitagawa, M., Kon, Y., Kuwayama, T. dan Monji, Y. 2008. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 421-430.
- Jones, K.L., dan King, S.S. 2009. Effect of domperidone suplementation of fescuefed heifers on plasma and follicular fluid fatty acid composition and oocyte quality. *Journal Animal Science* 87: 2227-2238.
- Johnson, M.H. dan Everitt, B.J. 2007. **Essential Reproduction**. Blackwell Publishing. Australia.
- Kainin, E.M., Said, S. dan Tappa. 2008. Kelahiran anak sapi hasil fertilisasi secara in vitro dengan sperma hasil pemisahan. *Media Peternakan* Vol.31 No.1.
- Kastrop, P.M.N., Bevers, M.M., Destree, OHJ. dan Kruip, A.M. 1990. Change in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fert* 90. 305-310.
- Khatir, H., Anouassi, A. dan Tibary, A. 2007. Effect of follicular size on *in vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*. 99. 413-420.
- Khatir, H., Carolan, C., Lonergan, P. dan Mermilliod, P. 1997. Characterization of calf follicular fluid and Its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocyte. *Journal of Reproduction and Fertility* 111(1): 267-275.
- Khatun, M., Mohammad, M.U.B., Jalal, U.A., Aminul, H., Mohammd, B.R. dan Mohammed, S. 2010. In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black bengal goat oocytes. *Journal of Veterinary Scienc* 12(1); 75-82.
- Knight, P.G., Muttukrishna, S. dan Groome, N.P. 1996. Development and application of a two-site enzymen immunoassay for the determination of total activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *J. Endocrinol.* 148, 267-279.

- Lapathitis, G., Miksik, I., Pavlok, A., dan Moltik, J. 2002. Improvement of in vitro maturation system for bovine oocytes and intracellular glutathione content. <http://www.iapg.cas.cz/uzfg/u2.htm> diakses 13 September 2013.
- Latifa, R. 2007. Pengembangan teknik pemanfaatan cairan folikel ovarium kambing sebagai upaya untuk meningkatkan produktifitas itik petelur. *Jurnal Protein* 15(2):130-140.
- Lechniak, D., Adamowicz, T., Stanislawski, D. dan Kaczmarek, D. 2002. In vitro maturation and fertilization of bovine oocyte in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val). *Reprod. Nutr. Dev* 42 275-280.
- Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G. dan Naitana, S. 1999. Follicular size affects the meiotic competence of in vitro matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod. Nutr. Dev* 39.503-508.
- Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callsen, H., dan Mermilliod, P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841-859.
- Lin, P.C., Abdallah, M.A., Ebien, A.C. dan Nakajima, S.T. 2002. Serum and follicular fluid hormonal levels during ovulation induction. *Fertil Steril* 77 (3).
- Lindsay, D.R., Entwistle, K.W. dan Winantea, A. 1982. *Reproduksi Ternak di Indonesia*. Universitas Brawijaya. Fakultas Peternakan. Malang.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. dan Gordon, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48-53.
- Lucas, X., Martinez, E.A., Roca, J., Vazquez, J.M., Gil, M.A., Pastor,L.M. dan Alabart, J.L., 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* 871-885.
- Malekshah, A.K., dan Moghaddam, A.E. 2005. Follicular fluid and cumulus cells synergistically improve mouse early embryo development in vivo. *Jurnal of Reproduction and Development* vol 51. No.2
- Malole, M.B M. 1990. **Kultur Sel dan Hewan**. Depdikbud Dirjen Dikti. IPB. Bogor
- McLaughlin, E.A. dan Mciver, S.C. 2009. Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. *Reproduction* 137: 1-11.
- McNatty, K.P., Reader, K., Smith, P., Heath, D.A., dan Juengel, J.L. 2007. Control of ovarian follicular development to The gonadotrophin-dependent phase. *Society of Reproduction and Fertility* 64: 55-68.

- Mondal, A., Khandoker, M.A.M.Y., Mondal, M.A., Rahman, A.H.M.S., Apu, A.S. dan Pervage, S. 2008. *In vitro* production of goat embryos. *Bang. J. Anim. Scie.* 37, 1-9.
- Motta, P.M. dan Makobe, S. 1992. Development of the ovarian surface and associated germ microscopy. *Cell Tissue Res* 226:493-570.
- Nalbandov, 1990. Reproduktive Phisiology of Mammals and Bird diterjemahkan oleh Sunarya Keman dalam Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Penerbit. Universitas Indonesia (UI, Press) Jakarta.
- Nandi, S., Raghu, H.M., Ravindranatha, B.M., Gupta, P.S.P. dan Sarma, P.V. 2004. In vitro development of buffalo oocyte in media-containing fluids from different size class follicle. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 33-38.
- Nava, G.H. dan Tajik, H. 2000. In vitro maturation of ovine follicular oocytes in different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum. *Theriogenology* 53: 435.
- Nicolas, M.O., Leese, G., Picton, H.M. dan Harris, S.E. 2005. Fluctuation in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 129:219-228.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. dan Suzuki, T. 1997. Bovine oocyte diameter inrelation to developmental competence. *Theriogenology* 48:769-774.
- Paramino, M.T. 2010. In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, 144-148.
- Partodiharjo, S, 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Penerbit Mutiara. Jakarta
- Pujol, M., Lopez-Bejar, M. dan Paramio, M.T. 2004. Developmental competence of heifer oocytes Selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61: 735-744.
- Qian, Y., Shi, W.O., Ding, J.T., Fan, B.Q. dan Fukui, Y. 2001. Effect of follicle fluid on cumulus expansion, in vitro fertilization, and development of porcine follicular oocyte. *Journal of Reproduction and Development*. Vol 47. no 3. 2001.
- Raghu, H.M., Nandi, S. dan Reddy, S.M. 2002. Follicle size oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *NCBI* 14 (1-2): 55-61.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B. dan Khadijah, W.E.W. 2008. In vitro maturation of oocytes with special reference to goat: A. Review. *Biotechnology* 7: 599-611.
- Rahman, M.G.M., Goswami, P.C., Khandoker, M.A.M.Y., Tareq, K.M.A. dan Ali, S.Z. 2004. Collection of bovine cumulus oocyte complexes (COCs) from slaughterhouse ovaries in Bangladesh. *Pak. J. Bio. Sci.* 6, 2054-2057.

- Rho, G.J., Hahnel, A.C. dan Betteridge, K.J. 2001. Comparisons of oocytes maturation times dan of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology* 56: 503-516.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M. dan Lucas, X. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev.* 10: 479-85.
- Rodrigues, B.A. dan Rodrigues, J.L. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 60: 59-66.
- Rosadi, B., Setiadi, M.A., Sajuthi, D. dan Boediono, A. 2011. Morfologi ovarium dan pengaruhnya terhadap morfologi folikel domba. *Jurnal Veteriner* Vol.12 No.2:91-97.
- Samad, H. A., Raza, A. dan Rehman, N. U. 1999. Effect of media on in vitro maturation, fertilization and early embryonic development in Nili-Ravi buffaloes. *International Journal of Agricultural & Biology* 1(3):128-130.
- Sayuti, A., Siregar, T.N., Akmal, M., Hamdan, dan Hamdani. 2007. The effect of the follicle size and follicle number per ovary on oocyte quality of local goat. *J. Ked. Hewan* Vol 1. No. 1.
- Schatten, H. dan Constantinescu, G.M. 2007. *Comparative reproductive biology*. Blackwell Publishing Asia. Australia.
- Schroeter, D. dan Meinecke, B. 1995. Comparative analysis of the polipeptide pattern of cumulus cell during maturation of porcine cumulus oocyte complexes *in vivo* and *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev* 35: 85-94.
- Shamsuddin, Larsson, M.B., dan Martinez, H.R. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture condition. *J. Anim. Reprod. Sci* 31:49-58.
- Smith, L.C., Olivera-Angel, M., Groome, N.P., Bhatia, B. dan Price, C.A. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicles in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 106(1): 193-199.
- Smith, J.E. 1990. **Prinsip Bioteknologi**. Gramedia. Jakarta
- Tabatabaei, S. dan Mamoei. 2010. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. *Springer-Verlag London*. Online journal at www.springerlink.com diakses 18 September 2013.
- Toelihere, M.R. 1985. **Fisiologi reproduksi pada ternak**. Angkasa. Bandung.
- Wahyuningsih, S. dan Djati, M.S. 2012. Protein expression of goat follicular fluid (GFF). *Journal of Agricultural Science and Technology* 2: 917-920.

- Wang, Z.G., Zu, Z.R. dan Yu, S.D. 2007. Effects of oocytes collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in boer goat. *J Anim Science* 52(1): 21-25.
- Wani, N.A., Wani, G.M. Khan, M.Z dan Salahudin, S. 2000. Effect of oocyte harvesting technique on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Rumin.* 36: 63-67.
- Wattimena, J. 2011. Pematangan oosit domba secara in vitro dalam berbagai jenis serum. *Agrinimal*, Vol.1, no1.22-27.
- Widayati, D.T. dan Wahyuningsih. 2010. Kriopreservasi embrio kambing peranakan etawa hasil produksi in vitro menggunakan metode vitrifikasi cryoloop. Proseding seminar “Peran teknologi reproduksi hewan dalam rangka swasembada pangan nasional”. Mayor Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Yatim, W. 1990. **Reproduksi dan Embriologi**. Penerbit Tarsito. Bandung
- Yoshida, M., Ishigaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K. dan Kojima, Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizability and developmental capacity *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95, 481-488.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan larutan NaCl

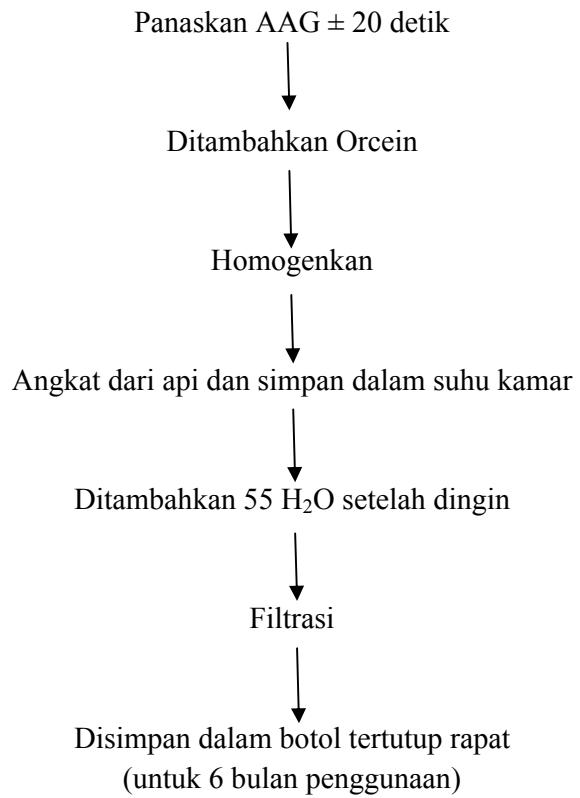
1. NaCl ditimbang sebanyak 9 gr.
2. Dimasukkan dalam Erlenmeyer 1000 ml dan ditambahkan aquadest sebanyak 1000 ml.
3. Dihomogenkan dengan menggunakan stirrer agar larutan menjadi homogen.
4. Larutan fisiologis dimasukkan dalam botol, masing-masing 100 ml dan ditutup dengan aluminium foil.
5. Botol yang telah berisi NaCl fisiologis disterilisasi di dalam autoklaf.
6. Botol dikeluarkan dari autoklaf dan disimpan dalam lemari, jika akan digunakan untuk mengumpulkan ovarium ditambahkan penicillin 0,006 g/100 ml dan streptomycin 0,01 g/100 ml.

Lampiran 2. Sterilisasi Alat

1. Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dengan air kran sebanyak 5-10 kali.
2. Alat-alat direndam dalam air yang mengandung teapol 1% selama semalam.
3. Alat-alat tersebut dicuci dengan air kran sebanyak 20 kali.
4. Dibilas dengan air destilasi
5. Alat-alat dimasukkan dalam oven dengan suhu 50°C sampai kering.
6. Dikeluarkan dari oven dan dibungkus dengan aluminum foil.
7. Alat-alat glassware kemudian disterilisasi dengan oven pada suhu 125°C selama tiga jam.
8. Alat-alat plastik dan larutan yang akan digunakan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit.
9. Alat yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari.

Lampiran 3. Pembuatan Aceto Orcein 1% (Staining)

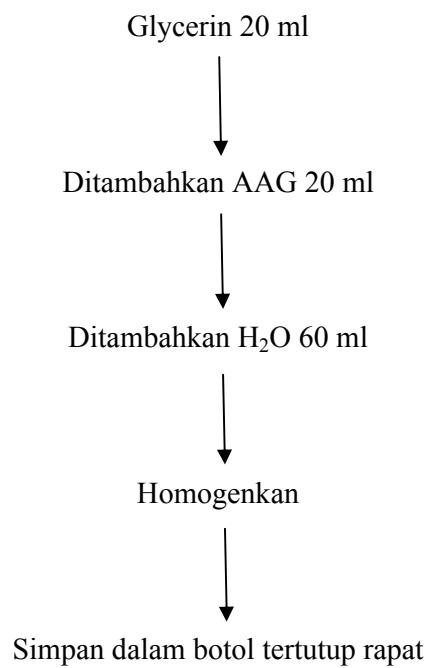
Bahan: Orcein 1 gr
 Acetic Acid Glacial (AAG) 45 ml
 H₂O 55 ml



Lampiran 4. Pembuatan Aceto Glycerin (destaining)

Bahan:

- Glycerin 20 ml
- AAG 20 ml
- H₂O 60 ml



Lampiran 5. Analisis ANOVA hubungan diameter oosit *immature* terhadap kualitas sel kumulus.

Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter_oosit	A	B	C
N		30	30	30	30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	6.3333	3.3000	1.7667
	Std. Deviation	.83045	4.09654	1.64317	.97143
	Absolute	.219	.125	.239	.252
Most Extreme Differences	Positive	.219	.125	.239	.252
	Negative	-.219	-.096	-.148	-.182
Kolmogorov-Smirnov Z		1.200	.687	1.310	1.378
Asymp. Sig. (2-tailed)		.112	.733	.065	.045

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	414.467	2	207.233	77.497	.000
	Within Groups	72.200	27	2.674		
	Total	486.667	29			
B	Between Groups	43.400	2	21.700	16.788	.000
	Within Groups	34.900	27	1.293		
	Total	78.300	29			
C	Between Groups	4.867	2	2.433	2.920	.071
	Within Groups	22.500	27	.833		
	Total	27.367	29			

Hasil perhitungan ANOVA diketahui terdapat pengaruh signifikan (P value <0.05) antara diameter Immature Oosit dengan Kualitas Oosit baik dan sedang, sendangkan untuk kualitas immature oosit C (P value = 0.071 > 0.05) tidak terdapat hubungan yang signifikan.

Uji lanjut Duncan

A

Duncan		Subset for alpha = 0.05		
Diameter_oosit	N	1	2	3
1.00	10	1.7000		
3.00	10		6.5000	
2.00	10			10.8000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

B

Duncan		Subset for alpha = 0.05	
Diameter_oosit	N	1	2
1.00	10	2.0000	
3.00	10	3.0000	
2.00	10		4.9000
Sig.		.060	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

C

Duncan		Subset for alpha = 0.05	
Diameter_oosit	N	1	2
3.00	10	1.2000	
2.00	10	2.0000	2.0000
1.00	10		2.1000
Sig.		.060	.808

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Lampiran 6. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS)

Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspansi1	Ekspansi2	Ekspansi3
N		15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	10.1333	3.2000	2.4000
	Std. Deviation	2.99682	1.32017	.98561
Most Extreme Differences	Absolute	.133	.218	.195
	Positive	.103	.218	.191
	Negative	-.133	-.194	-.195
Kolmogorov-Smirnov Z		.516	.846	.756
Asymp. Sig. (2-tailed)		.953	.472	.616

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspansi1	Between Groups	78.533	2	39.267	9.983	.003
	Within Groups	47.200	12	3.933		
	Total	125.733	14			
Ekspansi2	Between Groups	.400	2	.200	.100	.906
	Within Groups	24.000	12	2.000		
	Total	24.400	14			
Ekspansi3	Between Groups	5.200	2	2.600	3.714	.056
	Within Groups	8.400	12	.700		
	Total	13.600	14			

Uji Lanjut Duncan

Ekspansi1

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	7.4000	
3.00	5	10.0000	
2.00	5		13.0000
Sig.		.060	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Eksansi2

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
3.00	5	3.0000	
1.00	5	3.2000	
2.00	5	3.4000	
Sig.		.678	

Means for groups in homogeneous subsets
are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size =
5.000.

Eksansi3

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	5	1.6000	
3.00	5	2.6000	2.6000
1.00	5		3.0000
Sig.		.083	.464

Means for groups in homogeneous subsets are
displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 7. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 2 (TCM-199 + 10% cairan folikel)

Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspansi1	Ekspansi2	Ekspansi3
N		15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.2000	2.8667	2.6667
	Std. Deviation	3.62925	1.30201	1.17514
Most Extreme Differences	Absolute	.157	.259	.212
	Positive	.144	.259	.128
	Negative	-.157	-.149	-.212
Kolmogorov-Smirnov Z		.607	1.004	.820
Asymp. Sig. (2-tailed)		.855	.266	.512

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspansi1	Between Groups	148.800	2	74.400	25.079	.000
	Within Groups	35.600	12	2.967		
	Total	184.400	14			
Ekspansi2	Between Groups	4.133	2	2.067	1.265	.317
	Within Groups	19.600	12	1.633		
	Total	23.733	14			
Ekspansi3	Between Groups	12.133	2	6.067	10.111	.003
	Within Groups	7.200	12	.600		
	Total	19.333	14			

Uji lanjut duncan

Ekspansi1

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	4.8000	
3.00	5		10.8000
2.00	5		12.0000
Sig.		1.000	.292

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Ekspansi2

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
3.00	5	2.4000	
1.00	5	2.6000	
2.00	5	3.6000	
Sig.		.183	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Ekspansi3

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	1.4000	
2.00	5		3.2000
1.00	5		3.4000
Sig.		1.000	.690

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 8. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat ekspansi kumulus pada medium 3 (TCM-199 + 15% cairan folikel)

Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspansi1	Ekspansi2	Ekspansi3
N		15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.4667	2.5333	2.0000
	Std. Deviation	3.60291	1.45733	1.25357
Most Extreme Differences	Absolute	.165	.174	.187
	Positive	.165	.174	.187
	Negative	-.103	-.159	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.640	.675	.726
Asymp. Sig. (2-tailed)		.807	.752	.667

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspansi1	Between Groups	124.933	2	62.467	13.197	.001
	Within Groups	56.800	12	4.733		
	Total	181.733	14			
Ekspansi2	Between Groups	12.133	2	6.067	4.136	.043
	Within Groups	17.600	12	1.467		
	Total	29.733	14			
Ekspansi3	Between Groups	12.400	2	6.200	7.750	.007
	Within Groups	9.600	12	.800		
	Total	22.000	14			

Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan terdapat pengaruh diameter *immature* oosit terhadap tingkat ekspansi kumulus ($P<0.05$) sehingga perlu dilakukan uji lanjut.

Uji lanjut Duncan

Ekspansi1

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	5.4000	
2.00	5		11.2000
3.00	5		11.8000
Sig.		1.000	.671

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Eksansi2

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	1.4000	
1.00	5	2.6000	2.6000
2.00	5		3.6000
Sig.		.143	.216

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Eksansi3

Duncan^a

Diameter Oosit	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	1.0000	
2.00	5	1.8000	
1.00	5		3.2000
Sig.		.183	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 9. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 1 (TCM-199 + 10% FBS)

Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	GV	GVBD	M1	M2	TI
N	15	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}					
Mean	.4667	1.3333	1.9333	5.2667	1.1333
Std. Deviation	.63994	1.04654	1.03280	2.54858	.74322
Most Extreme Differences					
Absolute	.367	.225	.208	.213	.238
Positive	.367	.225	.208	.100	.238
Negative	-.233	-.175	-.192	-.213	-.229
Kolmogorov-Smirnov Z	1.422	.871	.804	.826	.921
Asymp. Sig. (2-tailed)	.035	.434	.538	.503	.364

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GV	Between Groups	1.733	2	.867	2.600	.115
	Within Groups	4.000	12	.333		
	Total	5.733	14			
GVBD	Between Groups	8.133	2	4.067	6.778	.011
	Within Groups	7.200	12	.600		
	Total	15.333	14			
M1	Between Groups	5.733	2	2.867	3.739	.055
	Within Groups	9.200	12	.767		
	Total	14.933	14			
M2	Between Groups	70.933	2	35.467	21.280	.000
	Within Groups	20.000	12	1.667		
	Total	90.933	14			
TI	Between Groups	1.733	2	.867	1.733	.218
	Within Groups	6.000	12	.500		
	Total	7.733	14			

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa diameter *immature* oosit berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$) sehingga dilakukan uji lanjut.

GV

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3.00	5	.0000
2.00	5	.6000
1.00	5	.8000
Sig.		.058

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

GVBDDuncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	.4000	
2.00	5	1.4000	1.4000
1.00	5		2.2000
Sig.		.064	.128

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M1Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	1.4000	
3.00	5	1.6000	1.6000
2.00	5		2.8000
Sig.		.724	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M2Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	2.2000	
2.00	5		6.6000
3.00	5		7.0000
Sig.		1.000	.633

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

T1Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1.00	5	.8000	
3.00	5	1.0000	
2.00	5	1.6000	
Sig.			.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 10. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 2 (TCM-199 + 10% Cairan Folikel)

Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	GV	GVBD	M1	M2	TI
N	15	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}					
Mean	.6000	1.2667	1.8000	5.2000	.3333
Std. Deviation	.82808	1.03280	1.14642	3.05193	.48795
Most Extreme Differences					
Absolute	.366	.202	.169	.203	.419
Positive	.366	.202	.164	.119	.419
Negative	-.234	-.161	-.169	-.203	-.247
Kolmogorov-Smirnov Z	1.416	.782	.655	.788	1.624
Asymp. Sig. (2-tailed)	.036	.574	.783	.564	.010

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GV	Between Groups	4.800	2	2.400	6.000	.016
	Within Groups	4.800	12	.400		
	Total	9.600	14			
GVBD	Between Groups	4.133	2	2.067	2.296	.143
	Within Groups	10.800	12	.900		
	Total	14.933	14			
M1	Between Groups	6.400	2	3.200	3.200	.077
	Within Groups	12.000	12	1.000		
	Total	18.400	14			
M2	Between Groups	109.200	2	54.600	30.906	.000
	Within Groups	21.200	12	1.767		
	Total	130.400	14			
TI	Between Groups	.933	2	.467	2.333	.139
	Within Groups	2.400	12	.200		
	Total	3.333	14			

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa diameter *immature* oosit berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$) sehingga dilakukan uji lanjut.

Uji Lanjut Duncan

GV

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	5	.2000	
3.00	5	.2000	
1.00	5		1.4000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

GVBD

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
3.00	5	.8000	
1.00	5	1.0000	
2.00	5	2.0000	
Sig.		.081	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M1

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	1.0000	
3.00	5	1.8000	1.8000
2.00	5		2.6000
Sig.		.230	.230

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M2

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	5	1.4000	
2.00	5		6.8000
3.00	5		7.4000
Sig.		1.000	.489

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

T1

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1.00	5	.0000	
2.00	5	.4000	
3.00	5	.6000	
Sig.		.066	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 11. Analisis ANOVA pengaruh diameter oosit *immature* terhadap tingkat maturasi inti pada medium 3 (TCM-199 + 15% Cairan Folikel)

Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	GV	GVBD	M1	M2	TI
N	15	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}					
Mean	.6667	.8667	2.0667	5.6000	.2667
Std. Deviation	.97590	.91548	1.43759	3.35517	.45774
Most Extreme Differences					
Absolute	.353	.295	.148	.147	.453
Positive	.353	.295	.125	.138	.453
Negative	-.247	-.225	-.148	-.147	-.280
Kolmogorov-Smirnov Z	1.366	1.142	.574	.571	1.755
Asymp. Sig. (2-tailed)	.048	.148	.897	.900	.004

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GV	Between Groups	9.733	2	4.867	16.222	.000
	Within Groups	3.600	12	.300		
	Total	13.333	14			
GVBD	Between Groups	5.733	2	2.867	5.733	.018
	Within Groups	6.000	12	.500		
	Total	11.733	14			
M1	Between Groups	23.333	2	11.667	25.000	.000
	Within Groups	5.600	12	.467		
	Total	28.933	14			
M2	Between Groups	130.800	2	65.400	29.284	.000
	Within Groups	26.800	12	2.233		
	Total	157.600	14			
TI	Between Groups	.533	2	.267	1.333	.300
	Within Groups	2.400	12	.200		
	Total	2.933	14			

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa diameter *immature* oosit berpengaruh terhadap tingkat maturasi inti ($p<0.05$) sehingga dilakukan uji lanjut.

Uji lanjut Duncan

GV

Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	.0000	
2.00	5	.2000	
1.00	5		1.8000
Sig.		.574	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

GVBDDuncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	5	.0000	
2.00	5		1.2000
1.00	5		1.4000
Sig.		1.000	.663

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M1Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	5	.4000		
3.00	5		2.4000	
2.00	5			3.4000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

M2Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.00	5	1.8000		
2.00	5		6.0000	
3.00	5			9.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

T1Duncan^a

Diameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1.00	5	.0000	
2.00	5	.4000	
3.00	5	.4000	
Sig.		.203	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 11. Analisis ANOVA pengaruh jenis medium terhadap kompetensi perkembangan oosit (ekspansi kumulus dan maturasi inti).

➤ Ekspansi Kumulus

Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Jenis_Medium	EK1	EK2	EK3
N	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}				
Mean	2.0000	28.8000	8.6000	7.0667
Std. Deviation	.84515	3.83964	2.92282	1.62422
Most Extreme Differences				
Absolute	.215	.198	.181	.165
Positive	.215	.183	.181	.165
Negative	-.215	-.198	-.144	-.150
Kolmogorov-Smirnov Z	.833	.766	.702	.639
Asymp. Sig. (2-tailed)	.492	.601	.707	.808

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
EK1	Between Groups	20.800	2	10.400	.672	.529
	Within Groups	185.600	12	15.467		
	Total	206.400	14			
EK2	Between Groups	10.000	2	5.000	.547	.592
	Within Groups	109.600	12	9.133		
	Total	119.600	14			
EK3	Between Groups	10.133	2	5.067	2.269	.146
	Within Groups	26.800	12	2.233		
	Total	36.933	14			

Hasil Analisis Anova menunjukkan bahwa hasil tidak signifikan ($p>0.05$) sehingga tidak perlu dilakukan uji Lanjut.

➤ Maturasi Inti

Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jenis_Medium	GV	GVBD	M1	M2	TI
N		15	15	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	1.7333	3.4667	5.8000	16.0667	1.7333
	Std. Deviation	.84515	1.09978	1.45733	1.61245	2.46306	1.62422
Most Extreme Differences	Absolute	.215	.281	.243	.216	.201	.208
	Positive	.215	.281	.157	.162	.201	.208
	Negative	-.215	-.186	-.243	-.216	-.114	-.143
Kolmogorov-Smirnov Z		.833	1.088	.940	.837	.778	.804
Asymp. Sig. (2-tailed)		.492	.187	.339	.486	.581	.538

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GV	Between Groups	.933	2	.467	.350	.712
	Within Groups	16.000	12	1.333		
	Total	16.933	14			
GVBD	Between Groups	5.733	2	2.867	1.433	.277
	Within Groups	24.000	12	2.000		
	Total	29.733	14			
M1	Between Groups	1.600	2	.800	.276	.764
	Within Groups	34.800	12	2.900		
	Total	36.400	14			
M2	Between Groups	4.133	2	2.067	.307	.741
	Within Groups	80.800	12	6.733		
	Total	84.933	14			
TI	Between Groups	20.933	2	10.467	7.850	.007
	Within Groups	16.000	12	1.333		
	Total	36.933	14			

Hasil Analisis Anova menunjukkan bahwa hasil tidak signifikan ($p>0.05$) sehingga tidak perlu dilakukan uji Lanjut.