



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH SUKROSA PADA VISUALISASI INTI OOSIT
DOMBA GARUT (*Ovis aries*) PASCAMATURASI DAN
PASCAKRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

ANANDA PERMATA RAMADHANI

1606836130

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2021



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH SUKROSA PADA VISUALISASI INTI OOSIT
DOMBA GARUT (*Ovis aries*) PASCAMATURASI DAN
PASKAKRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ANANDA PERMATA RAMADHANI
1606836130**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
2021**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Ananda Permata Ramadhani

NPM : 1606836130

Tanda tangan : 

Tanggal : 1 Mei 2021

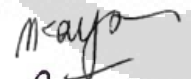
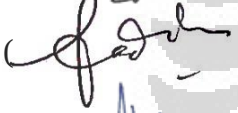
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Ananda Permata Ramadhani
NPM : 1606836130
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Sukrosa pada Visualisasi Inti Oosit Domba Garut (*Ovis aries*) Pascamaturasi dan Pascakriopreservasi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. ()
Pembimbing II : Dr. Dra. Ekayanti M. Kaiin, M.Si. ()
Penguji I : Fadhillah, S.Si., M. Agri., Ph.D. ()
Penguji II : Dr. Drs. Abinawanto, M.Si. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Agustus 2021

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini, banyak pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Oleh sebab itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. dan Dr. Dra. Ekayanti M. Kaiin, M.Si. selaku pembimbing yang bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing serta memberikan dukungan dan saran kepada penulis selama proses penelitian dan penulisan berlangsung.
2. Dr. Drs. Abinawanto, M.Si. dan Fadhillah, S.Si., M. Agri., Ph.D. selaku penguji, yang memberikan dukungan dalam memberikan kritik dan saran, agar tercapainya hasil penulisan skripsi yang baik.
3. Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc. selaku Ketua Departemen, Dr. Dra. Andi Salamah, selaku Ketua Program Studi S1 Departemen Biologi FMIPA UI dan Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Penasihat Akademik atas segala masukan, saran, dan perhatian kepada penulis selama perkuliahan berlangsung, serta segenap staf dosen pengajar atas ilmu yang diberikan selama proses perkuliahan.
4. Andika Putra Prabaswary S.Si, Dewi Mayang Sari, dan Naushad Sangkar Hazmi S.Si. selaku teman kerja di laboratorium atas segala kerjasama, bantuan, dukungan dan silaturahmi yang terjaga hingga saat ini.
5. Ibu Asri Martini, Pak Arif, Pak Taryono, Pak Taryana, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan dan dukungan yang diberikan kepada penulis.
6. Mama (Ati Sari Asih) dan Ayah (Susetyo Wantono) selaku orang tua tercinta atas segala pengorbanan, kasih sayang, doa, nasihat dan dukungan kepada penulis sehingga dapat menempuh pendidikan tinggi serta menjadi motivasi terbesar penulis untuk senantiasa berusaha menjadi anak yang membanggakan.
7. Teman Optimum (Dharma Rivaldo, Ersha Rizki, Farah Fadhilah, Intan Claudya, dan Jessica Elizabeth) yang telah menemani masa perkuliahan, sekaligus menjadi

rekan belajar setiap ujian serta menjadi sahabat suportif yang selalu mendukung setiap langkah pengembangan diri penulis selama ini.

8. Ahmad Dzikri Robbany atas semangat, waktu, nasihat, dan kesabaran yang selalu diberikan dan telah menjadi orang yang selalu mengingatkan kepada kebaikan.
9. Diri saya sendiri karena sudah bisa kuat, sabar, tetap bersyukur, tetap berproses walaupun perlahan, melawan ketidakstabilan diri karena *bipolar disorder* yang saya idap. Sekali lagi *I want to say thank you to my self* karena sudah berhasil bertahan sejauh ini.

Akhir kata penulis memohon maaf atas segala kesalahan kata atau perbuatan yang telah diperbuat dalam proses penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan dalam perkembangan ilmu pengetahuan. Terima kasih, semoga Allah selalu menyertai dan memberkahi seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Depok, 14 Juli 2021

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ananda Permata Ramadhani
NPM : 1606836130
Program Studi : Sarjana
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Sukrosa pada Visualisasi Inti Oosit Domba Garut (*Ovis aries*) Pascamaturasi dan Pascakriopreservasi

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 14 Juli 2021

Yang menyatakan



(Ananda Permata Ramadhani)

ABSTRAK

Nama : Ananda Permata Ramadhani
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Pengaruh Sukrosa pada Visualisasi Inti Oosit Domba Garut (*Ovis aries*) Pascamaturasi dan Pascakriopreservasi
Pembimbing : Dr. Lutfiralda Sjahfirdi, M.Biomed.
Dr. Dra. Ekayanti M. Kaiin, M.Si.

Penelitian ini menganalisis pengaruh pemberian sukrosa pada visualisasi inti oosit domba garut (*Ovis aries*) pascamaturasi dan pascakriopreservasi. Koleksi ovarium domba garut dilakukan di rumah potong hewan Sentul, Jawa Barat. *Slicing* ovarium dilakukan untuk dikoleksi oositnya. *Grading* dilakukan pada oosit yang terkoleksi. Oosit dengan *grade* A dan B dimaturasi menggunakan media maturasi TCM-199 dan diinkubasi selama minimal 24 jam di dalam inkubator. Total jumlah oosit yang telah mencapai metafase II (M II) setelah maturasi dibagi menjadi dua untuk dilanjutkan ke tahap kriopreservasi dalam waktu minimal satu minggu dan untuk diberi perlakuan inkubasi pada media sukrosa dengan konsentrasi 0%, 1%, 3%, dan 5% dalam waktu ± 10 menit persetiap perlakuan. Setelah diberi perlakuan, oosit diamati pembengkakan pada bagian intinya dengan menggunakan mikroskop fluoresens. Hasil uji statistik Kruskal-wallis menunjukkan ($P \leq 0,05$). Konsentrasi sukrosa 3% menjadi konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit domba garut pascamaturasi dan pascakriopreservasi.

Kata kunci : Domba garut, inti oosit, oosit, *Ovis aries*, pembengkakan inti, sukrosa.

xiv+50 : 9 gambar, 4 tabel, 15 lampiran.

Bibliografi : 35 (1982—2019)

ABSTRACT

Name : Ananda Permata Ramadhani
Study Program : Biologi S1 Reguler
Title : The Effect of Giving Sucrose for Visualization Garut Sheep
Oocyte Nucleus (*Ovis aries*) Post-maturation and Post-
cryopreservation
Conselour : Dr. Lutfiralda Sjahfirdi, M.Biomed.
Dr. Dra. Ekayanti M. Kaiin, M.Si.

This study analyzed the effect of sucrose addition on sheep oocyte (*Ovis aries*) for visualization of oocyte nucleus after maturation and post-cryopreservation. Sheep ovaries was collected from rumah potong hewan Sentul, Jawa Barat. Ovaries were sliced and oocyte was collected from ovaries. The collected oocytes were grading. Grade A and B oocytes were matured using maturation media TCM-199 and incubated for at least 24 hours in the incubator. The total number of oocytes that have reached metaphase II (M II) after maturation is divided into two for development to the cryopreservation stage in at least one week and to be given an incubation treatment on sucrose media with concentrations of 0%, 1%, 3%, and 5% in time $\pm$ 10 minutes per each treatment. After being treated, the oocyte was observed for swelling at its core using a fluorescence microscope. Kruskal-wallis test showed that ($P \leq 0,05$). The concentration of sucrose 3% becomes the optimal concentration to induce swelling of the oocyte core of garut sheep after maturation and post-cryopreservation.

Keywords : Garut sheep, nucleus, oocyte, sucrose, swollen nucleus.

xiv + 50 : 9 figures, 4 tables, 15 attachments

Bibliography : 35 (1982—2019)

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiiiv
 BAB 1 PENDAHULUAN.....	 1
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 4
2.1 Domba Garut (<i>Ovis aries</i> L.).....	4
2.2 Oosit.....	6
2.2.1 Folikulogenesis.....	6
2.2.2 Oogenesis.....	8
2.3 Maturasi Oosit <i>In Vitro</i>	9
2.4 Kriopreservasi Oosit.....	10
2.5 Sukrosa	11
 BAB 3 METODOLOGI	 13
3.1 Lokasi	13
3.2 Alat	13
3.3 Bahan.....	14
3.4 Objek Penelitian	15
3.5 Cara Kerja.....	15
3.5.1 Rancangan Penelitian	15
3.5.2 Skema Kerja	16

3.5.3 Pembuatan Stok Medium.....	17
3.5.4 Medium Kriopreservasi	20
3.5.5 Koleksi Ovarium.....	21
3.5.6 Koleksi Oosit	21
3.5.7 <i>Grading</i> Oosit	21
3.5.8 Maturasi Oosit	22
3.5.9 Pengamatan Ekspansi <i>Cumulus Oophorus</i>	23
3.5.10 Denudasi Oosit	24
3.5.11 Pewarnaan Oosit	24
3.5.12 Penambahan Sukrosa.....	25
3.5.13 Kriopreservasi oosit.....	27
 BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil.....	29
4.1.1 Tingkat Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut Setelah Maturasi	29
4.1.2 Tingkat Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi	30
4.2 Pembahasan	32
4.2.1 Pengaruh Sukrosa Terhadap Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi	32
4.2.1 Pengaruh Sukrosa Terhadap Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut setelah Pascakriopreservasi	33
 BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran	36
 DAFTAR ACUAN	37
LAMPIRAN	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	A= Domba garut jantan; B= Domba garut betina.....	4
Gambar 2.	Uterus dan ovarium.....	6
Gambar 3.	Skema Folikulogenesis.....	7
Gambar 4.	Diagram Oogenesis.....	9
Gambar 5.	A. Oosit <i>grade</i> A; B. Oosit <i>grade</i> B; C. Oosit <i>grade</i> C; D. Oosit <i>grade</i> D.....	22
Gambar 6.	Spot Maturasi (IVM).....	23
Gambar 7.	Gambar Berbagai Fase Oosit.....	25
Gambar 8.	Ukuran Medium Pada Straw.....	26
Gambar 9.	Kondisi oosit.....	32

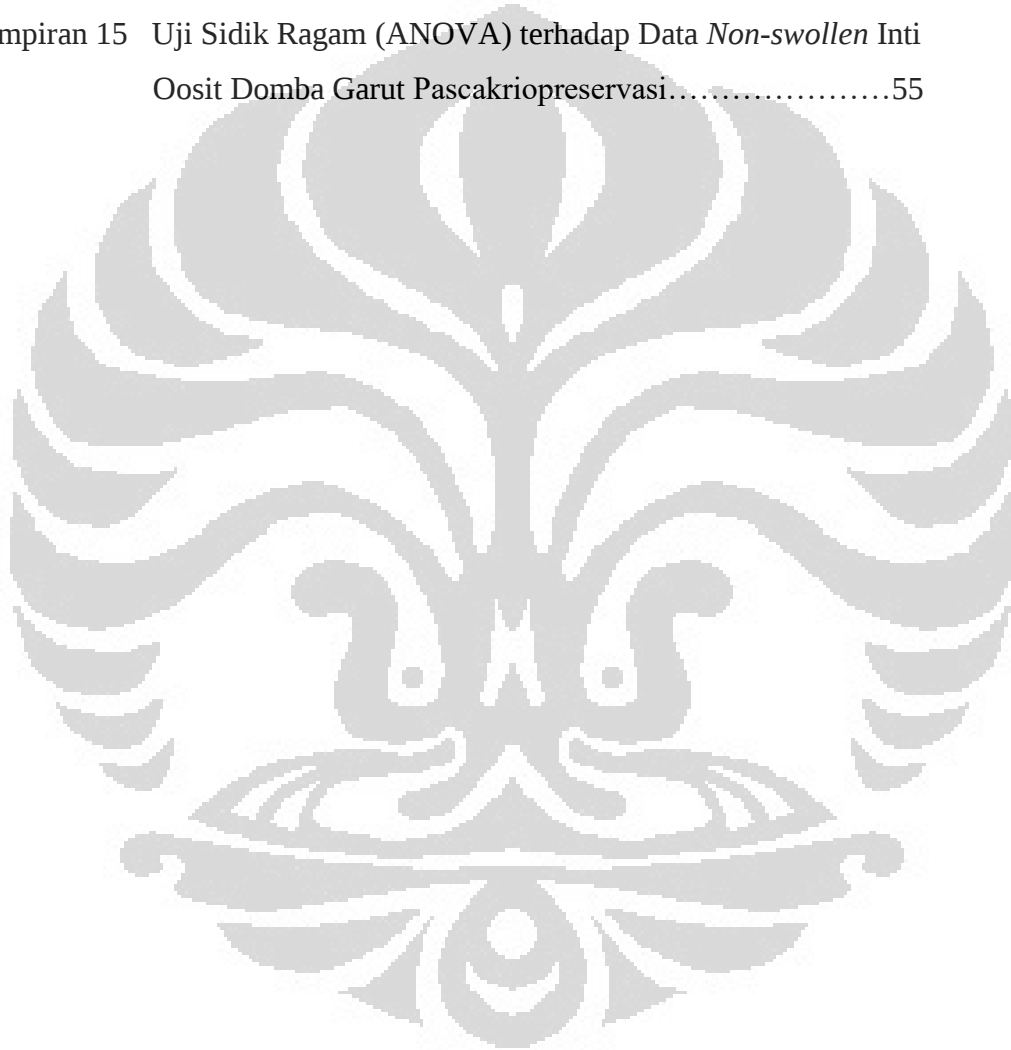
DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Klasifikasi Tingkat Kematangan Inti Oosit.....	24
Tabel 2.	Parameter Pengamatan Pembengkakan Oosit.....	26
Tabel 3.	Data Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut Setelah Maturasi.....	30
Tabel 4.	Data Pembengkakan Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi Medium.....	41
Lampiran 2	Data <i>Swollen</i> dan <i>Non-Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Setelah Maturasi.....	42
Lampiran 3	Data <i>Swollen</i> dan <i>Non-Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	43
Lampiran 4	Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	44
Lampiran 5	Uji Homogenitas Levene terhadap <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	45
Lampiran 6	Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis terhadap Data <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	46
Lampiran 7	Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap <i>Non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	47
Lampiran 8	Uji Homogenitas Levene terhadap <i>non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	48
Lampiran 9	Uji Sidik Ragam (ANOVA) terhadap Data <i>Non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi.....	49
Lampiran 10	Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	50
Lampiran 11	Uji Homogenitas Levene terhadap <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	51
Lampiran 12	Uji Non-Parametrik Kruskal-Wallis terhadap Data <i>Swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	52

Lampiran 13 Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap <i>Non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	53
Lampiran 14 Uji Homogenitas Levene terhadap <i>Non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	54
Lampiran 15 Uji Sidik Ragam (ANOVA) terhadap Data <i>Non-swollen</i> Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi.....	55



BAB 1

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang akan melakukan pengembangan domba menuju ekspor berkelanjutan. Kegiatan ekspor domba tersebut dilakukan karena laju populasi domba di Indonesia cukup tinggi mencapai 17.142.400 ekor pada tahun 2017. Kegiatan ekspor domba menyebabkan angka produksi daging domba dari rumah potong hewan di Indonesia cenderung tinggi mencapai 55.112 ton pada tahun 2017. Pada tahun 2018, terjadi penurunan angka produksi daging domba hingga 48.674 ton. Penurunan angka produksi daging domba ini disebabkan karena populasi domba pada tahun 2018 tidak mengalami peningkatan yang signifikan dari tahun sebelumnya yaitu hanya 17.397.000 ekor (Kementerian Pertanian RI 2019 : 4 – 5).

Domba garut (*Ovis aries L.*) merupakan salah satu jenis hewan potong di Indonesia yang ditanak untuk dimanfaatkan dagingnya. Domba garut sebagai hewan ternak dan hewan potong, mempunyai beberapa keunggulan. Satu ekor domba betina dapat menghasilkan rata-rata dua ekor anak atau lebih untuk setiap 8 bulannya. Tingkat pertumbuhan domba garut tinggi sehingga tubuhnya mencapai bobot 60 kg dalam waktu satu tahun. Domba garut memiliki umur dewasa kelamin 6 – 8 bulan, dan tidak memiliki musim kawin (Hastono 2001: 106; Yamin dkk. 2013: 15).

Permasalahan mengenai lambatnya laju reproduksi hewan potong di Indonesia dapat diminimalkan dengan bantuan teknologi reproduksi yang mulai berkembang. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan aplikasi teknologi transfer inti sel somatik (TISS). Transfer inti sel somatik (TISS) atau yang biasa dikenal dengan *somatic cell nuclear transfer* (SCNT) merupakan suatu teknik transfer inti dari sel donor ke dalam oosit yang telah dikeluarkan intinya (*enucleated oocyte*). *Enucleated oocyte* tidak memiliki materi genetik. Oleh karena itu, untuk mendapatkan embrio konstruksi yang diploid, oosit harus direkonstruksi dengan cara mentransfer sel somatik ke dalam *enucleated oocyte*. Proses enukleasi oosit dapat dilakukan secara mekanik menggunakan teknik mikromanipulasi sedangkan

proses introduksi sel donor dapat dilakukan dengan teknik mikroinjeksi (Luso dkk. 2013: 490).

Dalam upaya mempercepat laju reproduksi untuk produksi embrio, dukungan penelitian di bidang bioteknologi reproduksi hewan menjadi sangat penting. Teknik Transfer Inti Sel Somatik (TISS) dilakukan dengan memanfaatkan oosit segar dari Rumah Potong Hewan (RPH). Oosit dimaturasi hingga mencapai tahapan perkembangan metafase II (M II) untuk keperluan enukleasi. Oosit yang dapat mencapai tahap metafase II merupakan bentuk keberhasilan dari *teknik In Vitro Maturation* (IVM). Teknik IVM merupakan teknik pematangan oosit dari limbah ovarium secara *in vitro*. Banyak faktor yang akan memengaruhi hasil maturasi seperti komponen media maturasi, suplementasi, hormon, dan serum.

Kegagalan dalam enukleasi seringkali terjadi karena sulitnya melihat lokasi inti sel yang akan dienukleasi. Salah satu cara yang dianggap aman dan cukup efektif untuk memvisualisasikan inti oosit adalah dengan memberikan perlakuan medium hipertonis pada oosit yang telah mencapai tahap metafase II setelah maturasi dan pascakriopreservasi

Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa sukrosa telah berhasil digunakan sebagai medium hipertonis untuk dapat memvisualisasi inti oosit pada oosit sapi, babi, dan mencit tanpa merusak oosit. Keadaan hipertonis karena pemberian sukrosa dengan konsentrasi optimal dapat membuat oosit mengalami penyusutan sitoplasma dan mengubah konsentrasi protein sitoplasmik. Keadaan hipertonis ini kemudian menginisiasi perubahan sifat membran dan dinamika sitoskeleton sehingga memperlihatkan proyeksi dari hasil interaksi antara filamen aktin di permukaan kromosom dan benang spindel. Proyeksi tersebut berupa pembengkakan yang terjadi di daerah inti oosit yang disebut *nuclear swelling*. Pembengkakan yang terjadi membuat inti oosit lebih mudah terlihat di bawah mikroskop dan dapat meningkatkan keberhasilan dalam enukleasi (Kaiin dkk. 2018: 76).

Larutan yang terlalu hipertonis juga dapat membuat sitoplasma pada oosit mengalami penyusutan yang ekstrem dan mengakibatkan pembengkakan berlebihan yang dapat merusak oosit. Konsentrasi sukrosa yang tepat untuk dapat

membengkakkan inti oosit domba tanpa merusak sitoplasma untuk mempermudah visualisasi inti oosit pada tahap enukleasi perlu ditemukan.

Oosit yang berhasil dimaturasi tidak dapat disimpan dalam waktu yang lama di suhu ruang. Keterbatasan waktu simpan ini diatasi dengan teknik penyimpanan beku atau kriopreservasi oosit untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel sehingga viabilitas oosit dapat dipertahankan. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu di bawah -100°C dalam nitrogen cair. Oosit yang disimpan pada suhu di bawah -100°C hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme namun masih memiliki kemampuan hidup pada saat digunakan nantinya. Informasi mengenai efektivitas pemberian sukrosa untuk visualisasi oosit domba garut pascakriopreservasi belum pernah ditemukan. Karena itu, perlu ditemukan konsentrasi sukrosa yang tepat untuk dapat membengkakkan inti oosit domba tanpa merusak sitoplasma untuk mempermudah visualisasi inti oosit setelah maturasi maupun pascakriopreservasi. Parameter keberhasilan dari penelitian ini adalah terlihatnya pembengkakan pada bagian inti oosit domba dan utuhnya sitoplasma oosit domba setelah maturasi maupun pascakriopreservasi (Wang dkk. 2001: 432).

Penelitian mengenai efek sukrosa untuk membengkakkan inti oosit masih sedikit dilakukan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menggunakan oosit dari sapi, mencit, dan babi. Sejauh ini belum tersedia data mengenai konsentrasi sukrosa yang optimal untuk dapat membengkakkan inti oosit domba. Data ini diperlukan mengingat dibutuhkan visualisasi inti oosit domba (*Ovis aries* L.) setelah maturasi dan pascakriopreservasi tanpa merusak sitoplasma.

Tujuan dari penelitian ini adalah mencari konsentrasi sukrosa yang optimal untuk dapat membengkakkan inti oosit untuk mempermudah visualisasi inti oosit domba garut setelah maturasi dan pascakriopreservasi.

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian sukrosa dengan konsentrasi 3% optimal untuk membengkakkan inti oosit domba tanpa merusak sitoplasma oosit dan membantu visualisasi inti oosit domba garut (*Ovis aries* L.) setelah maturasi dan pascakriopreservasi. Konsentrasi 3% dipilih mengacu dari pra penelitian yang telah dilakukan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Domba Garut (*Ovis aries* L.)

Domba garut (*Ovis aries* L.) merupakan domba yang banyak ditemukan di daerah Garut, Jawa Barat. Domba garut merupakan domba hasil persilangan dari tiga domba yaitu, domba lokal, domba merino yang berasal dari Asia, dan domba capstaad yang berasal dari Afrika (Gambar 1). Domba garut memiliki bobot tubuh yang cukup besar dan kuat. Domba garut betina bobotnya mencapai 30 – 60 kg, sedangkan domba garut jantan bobot tubuhnya bisa mencapai dua kali dari bobot tubuh domba garut betina, yaitu sekitar 60 – 80 kg (Setiawan & Farm 2011: 20).



Gambar 1. A= Domba garut jantan; B= Domba garut betina

[Sumber: DITJEN PKH 2015: 1; Nurahmi 2011: 4]

Klasifikasi domba garut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Subfilum : Vertebrata

Kelas : Mamalia

Suku : Artidactyla

Bangsa : Bovidae

Marga : Ovis

Jenis : *Ovis aries* L. 1758 (ITIS 2018: 1).

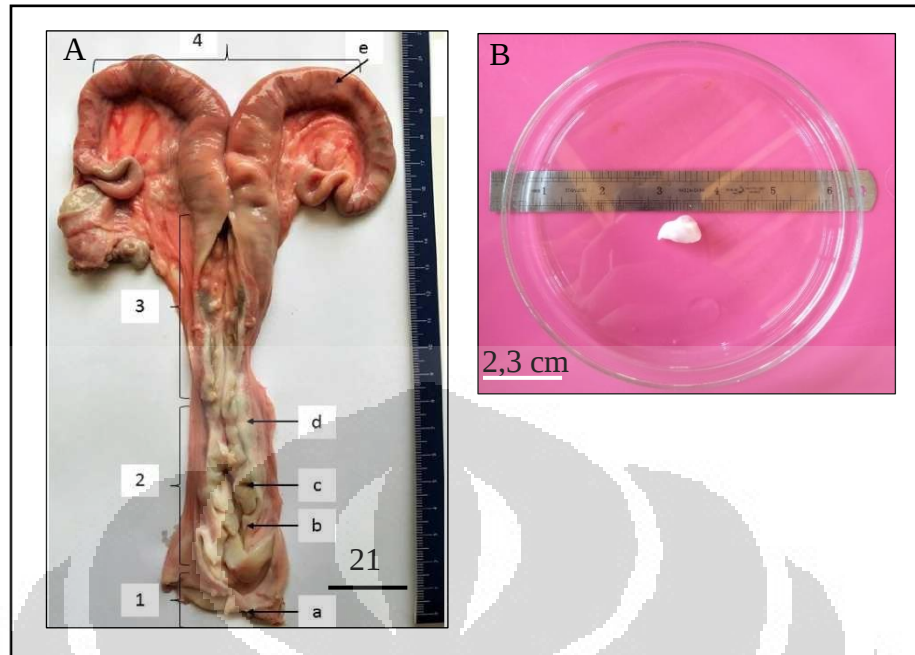
Domba garut dibagi ke dalam 2 tipe, yaitu domba tipe tangkas, dan domba tipe pedaging. Domba garut tipe tangkas adalah domba garut yang biasa dijadikan sebagai objek adu ketangkasan, karena itu domba tipe ini memiliki tanduk yang

kekar dan besar, serta telinga yang pendek atau kurang dari 9 cm. Domba garut tipe pedaging adalah kelompok domba garut yang mempunyai tubuh yang kompak, telinga yang berukuran lebih dari 9 cm, paha belakang cukup besar, dan warna dasar tubuhnya dominan putih (Wijaya 2017: 3).

Domba garut juga memiliki kualitas produktivitas yang tinggi, 1 ekor domba betina dapat menghasilkan rata-rata 2 ekor anak atau lebih untuk setiap 8 bulannya. Domba garut jantan berpotensi menghasilkan keturunan yang unggul, dan domba garut betina memiliki kemampuan bereproduksi sepanjang tahun (Yamin dkk. 2013: 15).

Domba garut memiliki organ reproduksi yang terdiri dari vulva, vagina, uterus (korpus uteri, servik uteri dan kornu uteri), oviduk (*isthmus*, *ampulla* dan *fimbriae*), dan ovarium. Organ-organ reproduksi berkembang sejalan dengan pertumbuhan tubuh ternak dan berkorelasi positif dengan berat dan ukuran tubuh ternak. Organ reproduksi akan berfungsi sempurna setelah fase pubertas yang ditandai dengan gejala birahi (estrus) dan siap untuk dikawinkan (Sanger 2012: 30). Uterus (Gambar 2 A) merupakan tempat pertumbuhan dan perkembangan bagi zigot domba hingga mencapai fase sempurna dan siap dilahirkan. Organ reproduksi primer domba betina adalah ovarium (Gambar 2 B), yang mampu menyimpan ovum, menghasilkan hormon estrogen, dan hormon progesteron.

Domba memiliki ukuran ovarium yang bervariasi, hal tersebut dipengaruhi umur domba dan tingkat kematangan dari sistem reproduksinya. Faktor umur dan kematangan sistem reproduksi menyebabkan semakin tua usia domba (>1 tahun) maka ukuran ovarium akan semakin besar (1–2 cm) (Ngadiyono dkk. 2009: 16).



Gambar 2. Uterus (1: Vagina, 2: Cervix, 3: Body of Uterus, 4: Uterine Horns, a: Vaginal, b: Superficial Cervical, c: Deep Cervical, d: Transcervical Laparoscopic, e: Oviduct); B. Ovarium

[Sumber: Bergstein dkk. 2017: 184 (A) & Dokumentasi Pribadi (B)]

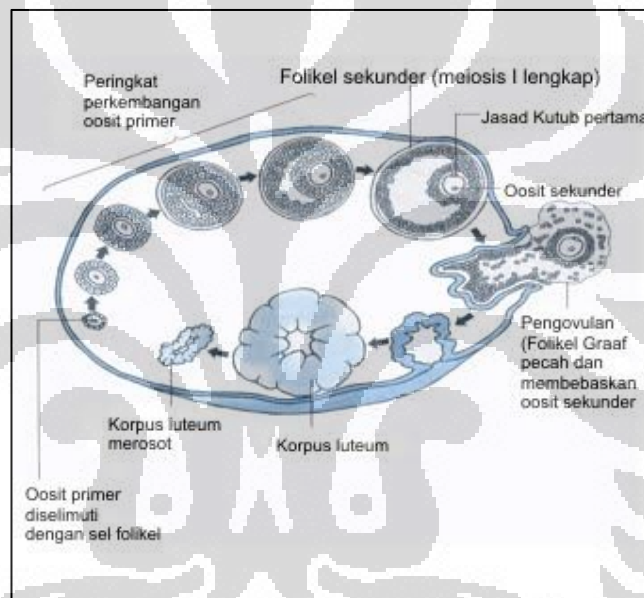
2.2 Oosit

2.2.1 Folikulogenesis

Folikulogenesis adalah proses pertumbuhan dan perkembangan folikel yang di dalamnya terjadi proses oogenesis. Oogenesis adalah suatu proses pembentukan, pertumbuhan, dan pematangan dari gamet betina yang dimulai sejak masa embrional sampai setelah dilahirkan dan mencapai puncaknya pada saat ovulasi (Austin & Short 1982).

Folikulogenesis berlangsung di bawah kendali hormon gonadotropin serta sekresi hormon dari sel granulosa dan sel teka. Kelompok hormon gonadotropin yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). FSH diproduksi di hipofisis anterior dan bertanggung jawab terhadap proliferasi dan diferensiasi folikel. Hormon estrogen termasuk dalam kelompok steroid yang produksinya berlangsung di sel teka dan sel-sel granulosa. Hormon estrogen bertanggung jawab terhadap pembentukan rongga folikel (Hurk dkk. 1997: 77).

Proses pada folikulogenesis meliputi proses yang dimulai dari berkembangnya folikel primordial menjadi folikel primer, sekunder, tersier, kemudian Graaf (Gambar 2). Folikel Graaf merupakan tahapan ketika folikel siap untuk ovulasi. Pada proses perkembangan tersebut tidak semua folikel akan menjadi folikel Graaf. Hal ini disebabkan adanya peristiwa gelombang folikular. Peristiwa gelombang folikular merupakan peristiwa ketika hanya ada satu buah folikel saja yang berkembang menjadi folikel dominan. Folikel dominan merupakan folikel yang mencapai ukuran terbesar, memiliki reseptor FSH tinggi, dan menekan laju pertumbuhan folikel lainnya sehingga folikel lain akan mengalami atresia atau mati (Boedino dkk. 2006: 131).



Gambar 3. Skema Folikulogenesis

[Sumber: Campbell dkk 2000: 162]

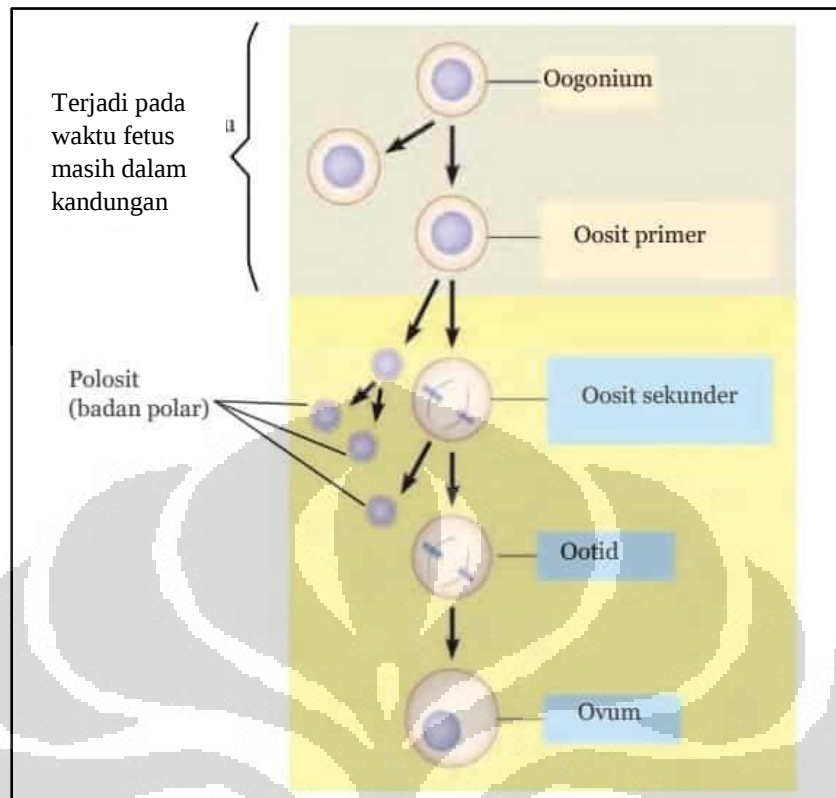
Domba memiliki dua hingga tiga gelombang folikular. Satu gelombang folikular terdapat 4 tahapan yang meliputi rekrutmen, seleksi, dominansi, dan atresia. Rekrutmen merupakan tahapan ketika folikel tertentu mulai tumbuh dengan ditandai meningkatnya FSH dan kadar LH rendah, serta folikel tumbuh dan memproduksi hormon estrogen. Tahapan seleksi merupakan tahapan ketika folikel kemudian diseleksi untuk memasuki tahapan dominansi. Folikel yang berhasil masuk tahap dominansi memiliki reseptor FSH paling tinggi dibanding folikel yang lain sehingga hanya folikel tersebut yang akan berkembang menjadi folikel

dominan. Folikel dominan kemudian akan mengalami ovulasi dan membentuk *corpus luteum* (CL) (Senger 2012: 164 – 165).

Folikulogenesis berkaitan dengan pematangan oosit. Proses pematangan oosit berlangsung di dalam cairan folikuler. Pematangan inti ditandai dengan adanya perubahan morfologi pada inti sel, yaitu perubahan dari diploten ke metafase II (M II). Sebelum ovulasi, inti oosit akan mengalami beberapa tahapan perkembangan yang meliputi *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle break down* (GVBD), metafase I (M I), anafase I (A I), telofase I (T I), dan metafase II (M II). Pada tahap M II, oosit akan mengalami ovulasi. Selama proses folikulogenesis juga terjadi maturasi sitoplasma yang ditandai dengan oosit dikelilingi *cumulus oophorus* yang mengalami perluasan (Pisestyani 2003: 5).

2.2.2 Oogenesis

Oogenesis adalah suatu proses pembentukan, pertumbuhan, dan pematangan dari gamet betina yang dimulai sejak masa embrional sampai setelah dilahirkan dan mencapai puncaknya pada saat ovulasi (Austin & Short 1982). Oogonium berkembang menjadi oosit primer kemudian inti oosit mengalami pembelahan menjadi dua sel, salah satu sel tersebut berukuran lebih besar disebut dengan oosit sekunder, dan yang berukuran lebih kecil disebut sebagai badan polar. Oosit sekunder berkembang di ovarium sampai tahap maturasi lalu dilepas ke tuba fallopii (Gambar 3) (Isnaeni 2006: 262).



Gambar 4. Diagram Oogenesis

[Sumber: Campbell dkk 2008]

Beberapa hormon yang dapat memengaruhi oogenesis, yaitu hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang merangsang pematangan folikel dan merangsang terjadinya ovulasi yaitu kondisi saat oosit sudah siap dibuahi, hormon LH (*Luteinizing Hormone*) yang juga berperan merangsang ovulasi, hormon estrogen yang membantu perkembangan seksual dan reproduksi, hormon progesteron yang berperan untuk menebalkan dinding rahim untuk tempat berkembangnya oosit. Hormon-hormon tersebut berperan penting dalam proses oogenesis dan memengaruhi ovulasi (Isnaeni 2006: 262).

2.3 Maturasi Oosit *In Vitro*

In vitro maturation (IVM) merupakan tahapan yang dapat memengaruhi keberhasilan dari proses transfer inti sel somatik (TISS). Serangkaian proses perkembangan oosit yang terjadi dimulai dari oosit yang *immature* menjadi oosit yang *mature*.

Proses perkembangan oosit selama maturasi meliputi pematangan inti dan pematangan sitoplasmik. Proses pematangan inti merupakan proses pembelahan meiosis I sampai metafase II. Proses ini diawali dengan terlihatnyautupan membran nukleus yang utuh dan kromatin filamentus, tahap ini dinamakan tahapan *germinal vesicle* (GV). *Germinal vesicle* (GV) akan rusak ditandai dengan kromatin terkondensasi dan membran nukleus tidak nampak, tahapan ini disebut sebagai *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Kromosom akan tersusun secara periferall pada pelat metafase di dalam ooplasma. Tahapan penyusunan kromosom pada pelat metafase menandai inti sudah mencapai tahap metafase I (M I). Selanjutnya, kromosom akan terkondensasi menjadi lebih padat dan muncul badan polar I sebagai tanda bahwa inti telah matang dan berada pada tahapan metafase II (M II) (Alvarenga & Maziero 2014: 153).

Kualitas oosit dapat memengaruhi hasil maturasi oosit itu sendiri. Berdasarkan kualitasnya, oosit terbagi menjadi 4 kelompok: oosit *grade* A, B, C, dan D. Oosit *grade* A adalah oosit yang dikategorikan sebagai oosit paling baik, memiliki kumulus yang seragam dan kompak dengan dikelilingi oleh lima lapisan atau lebih kumulus. Oosit *grade* B adalah oosit dengan kategori baik, memiliki sitoplasma yang gelap, dikelilingi tidak lebih dari lima lapisan kumulus. Oosit *grade* C adalah oosit dengan kategori kurang baik, memiliki sitoplasma yang transparan dan tidak merata, kumulus yang mengelilingi oosit tidak rata. Oosit *grade* D adalah oosit dengan kualitas buruk, memiliki sitoplasma yang transparan hingga terfragmentasi, tidak memiliki kumulus. Oosit dengan *grade* A dan B saja yang selanjutnya dimaturasi secara *in vitro* (Suprihatin 2008: 27).

2.4 Kriopreservasi Oosit

Kriopreservasi adalah proses penyimpanan oosit dengan pembekuan yang bertujuan untuk menghentikan sementara kegiatan hidup oosit tanpa mematikan fungsi oosit dan proses hidup tetap berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu di bawah -100°C dalam nitrogen cair. Oosit yang disimpan pada suhu di bawah -100°C hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme namun masih memiliki kemampuan hidup pada saat digunakan nantinya. Ada beberapa metode

kriopreservasi oosit yang sudah berhasil dilakukan di antaranya adalah pembekuan lambat (*slow freezing*) dan pembekuan cepat (*rapid freezing*) serta pembekuan sangat cepat (*ultra rapid freezing*) (Widyastuti dkk. 2017: 253).

Setiap teknik kriopreservasi mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari kriopreservasi secara umum antara lain bahan atau materi dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas, dapat dikoleksi setiap saat, dan dapat digunakan kapan saja bila dibutuhkan. Selain itu, teknik kriopreservasi dapat dilakukan untuk tujuan melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan, tidak perlu mengimpor atau memelihara pejantan-pejantan unggul, tidak membutuhkan ruangan yang besar karena tabung nitrogen cair cukup memadai untuk menyimpan bahan dalam ragam dan jumlah yang banyak, dan tidak menyebabkan perubahan materi genetik yang disimpan. Kekurangannya adalah biaya pelaksanaan cukup mahal, memerlukan tenaga yang terampil dan berpengalaman, dan nitrogen cair perlu tersedia secara kontinyu (Kostaman & Setioko 2011: 146).

Keberadaan krioprotektan dalam medium *freezing* dapat memengaruhi keberhasilan teknik kriopreservasi. Krioprotektan berfungsi sebagai pelindung, stabilitas, dan pengganti reaksi kimia dan biologi di dalam sel selama proses kriopreservasi berlangsung. Dalam teknik kriopreservasi, terdapat dua jenis krioprotektan yang digunakan, yaitu krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler. Kelompok krioprotektan intraseluler meliputi dimethyl sulfoxide (DMSO), gliserol, etilen glikol dan propylene glycol (1,2-propanediol), sementara kelompok krioprotektan ekstraseluler meliputi 2- methyl-2,4-pentenediol (MPD), asam amino seperti alanin, prolin dan glisin serta polimer seperti polyvinyl pyrrolidone, pati hydroxyethyl, dan sukrosa (Fuller 2004: 377; Bhattacharya & Prajapati 2016: 3; Jang dkk. 2017: 14--15).

2.5 Sukrosa

Sukrosa adalah senyawa organik terutama golongan karbohidrat. Sukrosa termasuk kedalam golongan gula disakarida yang berarti terbentuk dari dua molekul gula yaitu, D-glukosa dan D-fruktosa. Rumus molekul sukrosa adalah $C_{12}H_{22}O_{11}$, sukrosa memiliki struktur kristal monosiklik (Sumbono 2016: 46).

Kristal monosiklik pada sukrosa bentuknya sangat bervariasi. Bentuk, keadaan badan kristal, dan warna kristal sukrosa sangat tergantung pada kemurniannya. Sukrosa murni tidak berwarna dan transparan. Sukrosa memiliki sifat sedikit higroskopis dan mudah larut dalam air serta mudah dipengaruhi oleh zat lain yang terlarut dalam air dan sifat zat tersebut. Semakin tinggi suhu dan jumlah garam terlarut dalam air maka semakin tinggi pula jumlah sukrosa yang dapat terlarut, terutama garam yang mengandung nitrogen, seperti protein dan asam amino (Sumbono 2016: 47)

Sukrosa yang dilarutkan dengan air dapat menjadi larutan yang hipertonis pada kondisi tertentu. Larutan hipertonis adalah jenis larutan yang memiliki konsentrasi yang lebih besar dari zat terlarut di luar sel jika dibandingkan dengan bagian dalam sel. Larutan hipertonis dapat menyebabkan sel mengerut dan menyusut (Campbell dkk. 2004: 110).

Keadaan hipertonis karena pemberian sukrosa dengan konsentrasi optimal dapat membuat oosit mengalami penyusutan dan mengubah konsentrasi protein sitoplasmik. Keadaan ini kemudian menginisiasi perubahan sifat membran dan dinamika sitoskeleton sehingga memunculkan proyeksi dari hasil interaksi antara filament aktin di permukaan kromosom dan spindel. Proyeksi tersebut berupa pembengkakan yang terjadi di daerah inti oosit yang disebut *nuclear swelling*. Pembengkakan yang terjadi membuat inti oosit lebih mudah terlihat di bawah mikroskop dan dapat meningkatkan keberhasilan dalam enukleasi (Kaiin dkk. 2018: 76).

BAB 3

METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian berlangsung selama tiga bulan dimulai dari Juli sampai dengan September 2020. Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium Bioteknologi Reproduksi Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Bogor, Jawa Barat.

3.2 Alat

3.2.1 Pembuatan Medium

Alat yang digunakan yaitu labu Erlenmeyer 100 mL [IWAKI PYREX], labu Erlenmeyer 500 mL [IWAKI PYREX], timbangan digital [SHIMADZU], spatula, mikro pipet 1–10 μ L [Eppendorf], mikro pipet 10–100 μ L [Eppendorf], mikro pipet 100–1000 μ L [Eppendorf], mikrotips 1–10 μ L [Eppendorf], mikrotips 10–100 μ L [Eppendorf], mikrotips 100–1000 μ L [Eppendorf], gelas ukur 500 mL [IWAKI PYREX], gelas ukur 100 mL [IWAKI PYREX], lemari pendingin -5° C [Sanken], freezer -20° C [Ing-Climas], laminar air flow [Telstar-BH], pembakar Bunsen, disposable syringe 10 mL [Terumo], disposable syringe 5 mL [Terumo], filter mikro 0,22 μ m [Corning®], hotplate [Minitube 50], botol Duran 500 ml [Schott], botol Duran 1000 mL [Schott], tutup botol Duran 500 ml [Schott], tutup botol Duran 1000 mL [Schott], mikro tube [Eppendorf], tabung 2 mL [Axygen], autoklaf [Raypa], sendok timbang, sealer pemanas, tabung sentrifuge 5 mL, nampan plastik, oven [Raypa].

3.2.2 Koleksi Ovarium

Alat yang digunakan yaitu spidol permanen F4 [Snowman], botol semprot, pinset, gunting bedah, *thermos* [Minitube], aki motor [Yuasa], pisau *scalpel* [GEA], kotak *coolbox* [Marina], botol kaca 30 mL.

3.2.3 Handling Oosit

Alat yang digunakan yaitu kaca arloji, korek api, mata gerinda, pipa kapiler 1,1–1,2 mm [Marienfield], *syringe pipet handling* [Terumo], *petri dish disposable* [Corning], *5 well plate* [Axygen], *waterbath*.

3.2.4 Pengamatan Oosit

Alat yang digunakan yaitu *personal computer* [DELL], mikroskop fluoresens [Imager. Z2 Zeiss], mikroskop inverted [NIKON Diaphot 300], mikroskop binokuler [NIKON SMZ1270], kaca objek cekung [Sail Brand], inkubator [Thermo Scientific Heracell 150i].

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan selama penelitian terdiri dari alkohol 70%, larutan fisiologis *Ringer Laktat* (RL) [Otsu], akuabides, *Dulbecco Phosphate Buffered Saline* (DPBS) [SIGMA D5652], $MgCl_2$ [MERCK], $CaCl_2$ [MERCK], *Bovine Serum Albumin* (BSA), Calf Serum, antibiotik Gentamicin [INDOFARMA 40mg/mL Inj.], *Tissue Culture Medium* (TCM-199) [SIGMA M5017], *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) [INTERVET HOLLAND], *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) [INTERVET HOLLAND], estradiol, sodium piruvat, antioksidan Glutathione, sukrosa [MERCK], *mineral oil*, dan nitrogen cair.

3.3.2 Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan selama penelitian terdiri dari tisu, sarung tangan lateks, masker, kertas timbang, pipa kapiler 1,1 – 1,2 mm, kertas label, *aluminium foil*, plastik *ziplock*, *mikrotips*, dan *mikrofilter* 0,22 μm , *disposable petri dish*, dan *straw*.

3.4 Objek Penelitian

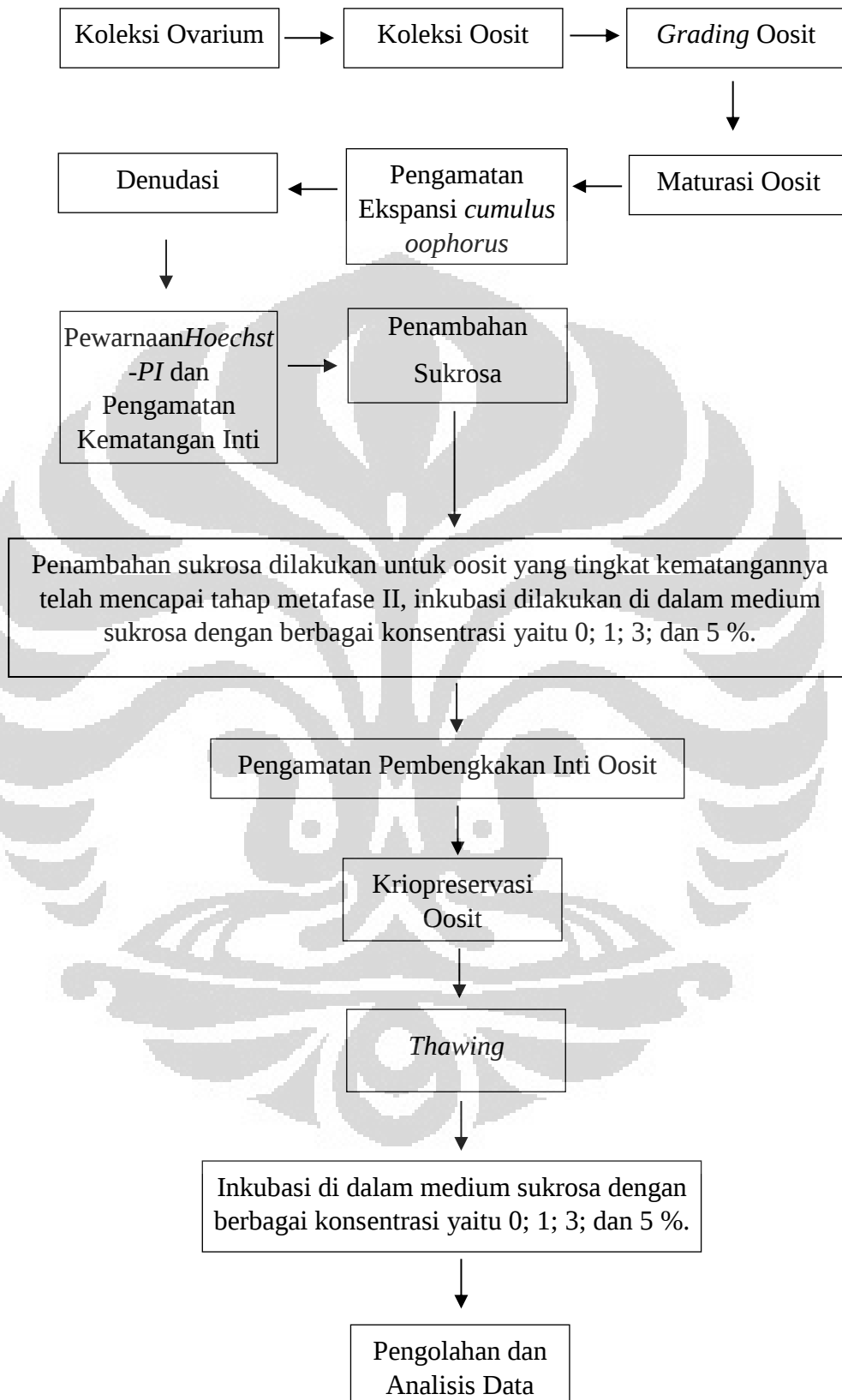
Objek penelitian yaitu oosit domba garut (*Ovis aries* L.) kualitas A dan B yang berasal dari ovarium domba garut limbah pemotongan Rumah Potong Hewan (RPH) di Jl. Raya Cijulang, Desa Cadas, Sukaraja, Sentul, Jawa Barat.

3.5 Cara kerja

3.5.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam 4 kelompok perlakuan yang merujuk berdasarkan rumus Frederer $(n-1) (t-1) \geq 15$ (Prihanti 2016: 13). Berdasarkan rumus tersebut, didapatkan bahwa pengulangan yang digunakan dalam penelitian ialah sebanyak lebih dari 6 kali pengulangan oosit. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ialah menambahkan sukrosa dengan konsentrasi 0 %, 1 %, 3 %, dan 5 %.

3.5.2 Skema Kerja



3.5.3 Pembuatan Stok Medium

3.5.3.1 Pembuatan Medium Koleksi Ovarium

Medium koleksi ovarium dibuat sebanyak 100 mL dan disimpan ke dalam botol kaca 150 mL. Bahan-bahan kimia yang perlu disiapkan yaitu ringer laktat 100 mL dan antibiotik Gentamicin sebanyak 100 μ L (Lampiran 2). Larutan ringer laktat dimasukkan ke dalam botol kaca dengan menggunakan *syringe* steril hingga mencapai 100 mL. Antibiotik Gentamicin sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam larutan ringer laktat. Medium koleksi ovarium diberi label pada botolnya dan disimpan ke dalam freezer -5°C (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.3.2 Pembuatan Stok Medium PBS

Medium (*Phosphate Buffer Saline*) PBS stok (Lampiran 2) dibuat sebanyak 1 L dan disimpan ke dalam botol Duran 1 L. Bahan-bahan kimia yang perlu disiapkan yaitu: DPBS+ powder (9,6 g/L), CaCl_2 0,1 g, MgCl_2 0,1 g, dan akuabides sebanyak 1 L. Beberapa alat yang perlu disiapkan antara lain labu Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 100 mL, botol Duran 1000 mL, mikropipet 1000 mL, mikrotips 1000 mL, dan filter mikro 0,22 μ m. CaCl_2 dan MgCl_2 dilarutkan terlebih dahulu dengan akuabides sebanyak 100 mL, kemudian dilanjutkan dengan DPBS+ powder yang dilarutkan dengan akuabides sebanyak 900 mL. Medium (*Phosphate Buffer Saline*) PBS yang sudah tercampur sempurna antara CaCl_2 , MgCl_2 , dan DPBS+ powder kemudian disaring dengan menggunakan filter mikro 0,22 μ m dan ditempatkan ke dalam botol Duran. Medium PBS tersebut diberi label kemudian disimpan di dalam freezer -5°C (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.3.3 Pembuatan Stok Medium Koleksi

Medium koleksi merupakan medium yang digunakan untuk mencacah ovarium sehingga didapatkan oosit yang kemudian akan dikoleksi. Medium koleksi dibuat sebanyak 500 mL yang disimpan di dalam botol Duran [Schott]. Pengerjaan pembuatan medium dilakukan di dalam laminar *airflow* dan dilakukan secara

aseptis dengan penggunaan masker dan sterilisasi tangan dengan alkohol. Alat-alat yang perlu dipersiapkan antara lain: Gelas ukur 100 mL, *syringe* 10 mL, labu Erlenmeyer 500 mL, filter mikro 0,22 μm , mikropipet 1000 μL , mikrotips 1000 μL , tabung Eppendorf 2 mL, dan lemari pendingin -5°C .

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan medium ini adalah DPBS+ sebanyak 500 mL; BSA (3mg/mL) sebanyak 1,5 g; Gentamicin sebanyak 500 μL , akuabides (Lampiran 2). DPBS+ stok dituang hingga mencapai volume 500 mL. Larutan Gentamicin dicampurkan ke medium. Kristal BSA dimasukkan ke medium serta didiamkan hingga semuanya terlarut sempurna (sekitar 15 menit). Larutan tersebut kemudian disaring dengan menggunakan filter mikro 0,22 μm , kemudian disimpan dalam botol Duran steril. Botol Duran berisi medium koleksi yang sudah disaring disimpan dalam freezer -5°C (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.3.4 Pembuatan Stok Medium *Handling*

Medium yang digunakan selama penelitian adalah medium *handling*. Medium *handling* (Lampiran 2) merupakan medium yang digunakan ketika *handling* oosit pada keseluruhan proses penanganan oosit. Medium yang digunakan pada penelitian dibuat berdasarkan komposisi bahan kimia dan prosedur kerja. Medium *handling* stok dibuat sebanyak 100 mL dan disimpan di dalam botol Duran 500 mL. Medium *handling* dibuat secara aseptis di dalam laminar *air flow* dan seluruh tangan serta alat kerja disemprot alkohol terlebih dahulu.

Beberapa bahan kimia yang harus disiapkan untuk pembuatan medium *handling* antara lain: DPBS+ sebanyak 0,98 g, MgCl_2 sebanyak 0,01 g, CaCl_2 sebanyak 0,01 g, dan BSA (5mg/mL) sebanyak 0,5 g. Masing-masing bahan kimia yang berupa padatan ditimbang sesuai dengan jumlah yang telah ditetapkan. DPBS+, MgCl_2 , CaCl_2 yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuabides sehingga volume mencapai 100 mL. Kristal BSA dimasukkan di urutan paling akhir dan didiamkan sampai larut dengan sendirinya secara sempurna (sekitar 15 menit). Larutan tersebut kemudian difilter dengan filter mikro 0,22 μm dan botol steril sebagai wadah penampungan larutan yang sudah disaring. Setelah keseluruhan larutan difilter, larutan yang merupakan

medium *handling* dituang ke dalam botol Duran, dilapisi penutup parafilm terlebih dahulu, diberi label, dan disimpan di dalam freezer -5°C (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.3.5 Pembuatan Stok Medium Maturasi

Medium maturasi merupakan medium yang digunakan untuk mematangkan oosit sehingga inti oosit dapat melakukan pembelahan hingga mencapai fase Metafase II (M II). Oosit terlebih dahulu dimasukkan ke dalam medium cuci agar zat pengotor berupa lemak dan darah dari koleksi ovarium dapat hilang. Pembuatan medium cuci diawali dengan 1000 μL stok medium maturasi dimasukkan ke dalam cawan petri kecil hingga batas cawan petri tersebut. Cawan petri tersebut kemudian disimpan di dalam inkubator CO_2 5%, dengan temperatur $38,5^{\circ}\text{C}$ selama ± 24 jam. Medium maturasi dibuat sebanyak 500 mL yang digunakan sebagai stok. Seluruh pengerjaan pembuatan medium dilakukan di dalam laminar *airflow* dan dikerjakan secara aseptis. Beberapa bahan yang harus dipersiapkan antara lain: TCM-199 sebanyak 26 mL, BSA sebanyak 0,24 g, hormon FSH sebanyak 300 μL , hormon HCG sebanyak 300 μL , hormon estradiol sebanyak 30 μL , sodium piruvat sebanyak 30 μL , dan Gentamicin sebanyak 30 μL . Beberapa alat yang perlu disiapkan antara lain: gelas ukur 100 mL, Erlenmeyer 100 mL, mikropipet 1000 μL , mikrotips 1000 μL , filter mikro 0,22 μm , *syringe* 10 mL, dan botol Duran 500 mL (Lampiran 2). Masing-masing bahan kimia yang sudah diukur dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan diencerkan hingga mencapai volume 500 mL. Padatan BSA dimasukkan terakhir setelah semua bahan kimia dicampurkan, BSA didiamkan hingga larut sempurna (sekitar 15 menit). Setelah seluruh bahan kimia dicampurkan termasuk Gentamicin, larutan tersebut kemudian disaring menggunakan filter mikro 0,22 μm . Larutan yang sudah disaring kemudian dimasukkan ke dalam botol Duran 500 mL dan disimpan ke dalam freezer -5°C (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

Oosit akan dimatangkan di dalam spot-spot maturasi. Spot maturasi dibuat agar oosit yang akan dimatangkan secara IVM dapat matang secara sempurna dan mengurangi risiko kontaminasi. Pembuatan spot medium maturasi diawali dengan stok medium maturasi sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam cawan petri kecil

berdiameter 4 cm, medium maturasi tersebut dibuat menjadi empat spot. *Mineral oil* dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 2000 μL pada bagian tepi cawan. Cawan petri tersebut kemudian disimpan ke dalam inkubator CO_2 5%, temperatur $38,5^\circ\text{C}$ selama ± 24 jam (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.4 Medium Kriopreservasi

3.5.4.1 Medium Adaptasi

Medium adaptasi merupakan medium yang digunakan untuk kriopreservasi oosit ketika akan dimasukkan ke dalam straw. Komposisi dari medium adaptasi adalah BSA, Gentamicin, dan DPBS+. Stok medium adaptasi dibuat sebanyak + 10 mL. Sebanyak 8 mL DPBS+ dan 25 μL Gentamicin dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Sebanyak 0,3 g/mL BSA dimasukkan dan didiamkan hingga terlarut sempurna tanpa diaduk (sekitar 15 menit), kemudian DPBS+ ditambahkan hingga volume medium adaptasi mencapai 10 mL. Setelah semua komposisi medium dicampur, larutan tersebut disaring dengan menggunakan filter mikro 0,22 μm . Medium adaptasi tersebut dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Lampiran 2) (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.4.2 Medium *Slow Freezing*

Medium pembekuan (*freezing*) berfungsi untuk menjaga viabilitas dari oosit ketika dilakukan prosedur kriopreservasi. Medium *freezing* terdiri dari larutan DPBS+, BSA FAF 0,4%, 10% etilen glikol, sukrosa 0,1 M, dan 0,1% antibiotik penisilin-streptomisin. Penisilin-streptomisin sebanyak 25 μL dan 0,855 g sukrosa 0,1 M dimasukkan ke dalam 24,475 mL larutan DPBS+. BSA FAF 0,4% sebanyak 0,10 g ditambahkan kepada larutan dan didiamkan hingga terlarut sempurna selama + 15 menit. Larutan yang sudah tercampur sempurna kemudian ditambahkan 2500 μL etilen glikol dan ditunggu selama 10 menit agar tercampur sempurna. Medium *freezing* disaring dengan menggunakan filter mikro 0,22 μm dan dituang ke dalam botol Duran yang disimpan dalam *freezer* -5°C (Lampiran 2). (Formulasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

3.5.5 Koleksi Ovarium

Koleksi ovarium dilakukan pada pagi hari pukul 04.30 – 06.00 atau 08.00 – 09.30 di Rumah Potong Hewan Sentul, Jawa Barat. Ovarium dipisahkan dari organ reproduksi domba dan lemak dengan menggunakan gunting bedah. Ovarium kemudian dicuci di dalam larutan fisiologis Ringer Laktat (RL) yang mengandung antibiotik Gentamicin agar bersih dari pengotor. Ovarium yang sudah bersih dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* berisi larutan fisiologis RL dan disimpan di dalam termos elektrik yang suhunya telah diatur menjadi 37°C. Penyimpanan ini bertujuan agar kondisi ovarium tetap stabil selama perjalanan menuju laboratorium (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020).

3.5.6 Koleksi Oosit

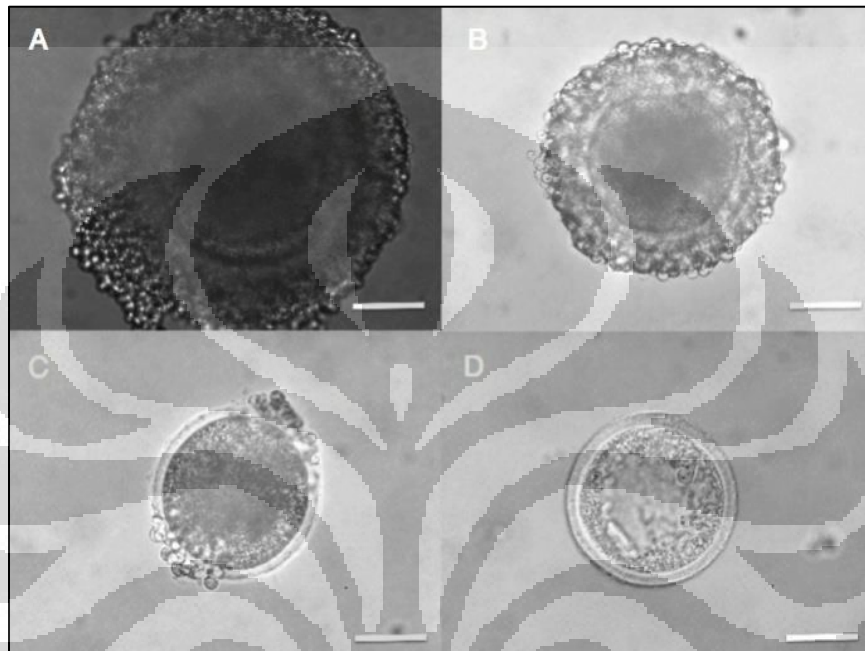
Ovarium yang telah dikoleksi dari rumah potong hewan kemudian disayat (*slicing*) menggunakan *scalpel*. Proses *slicing* dilakukan di dalam medium *slicing* dengan tujuan untuk mengeluarkan oosit yang berada di dalam folikel ovarium agar dapat dikoleksi. Oosit yang berhasil dikeluarkan dari folikel ovarium kemudian dipindahkan ke dalam medium *handling* yang disimpan di atas *hotplate*. Oosit dipindahkan dari medium *slicing* ke medium *handling* dengan menggunakan pipet *handling* di bawah mikroskop stereo. Komposisi dari medium *slicing* dan medium *handling* tertulis pada lampiran (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020).

3.5.7 Grading Oosit

Oosit yang telah dipindahkan ke dalam medium *handling* kemudian diamati kualitasnya di bawah mikroskop stereo. Oosit dapat dikelompokkan ke dalam empat *grade* (Gambar 5) berdasarkan kualitasnya yaitu:

- Oosit *grade A* : Oosit yang dikategorikan sebagai oosit paling baik, memiliki kumulus yang seragam dan kompak dengan dikelilingi oleh lima lapisan atau lebih kumulus.
- Oosit *grade B*: Oosit dengan kategori baik, memiliki sitoplasma yang gelap, dikelilingi tidak lebih dari lima lapisan kumulus.

- Oosit *grade C* : Oosit dengan kategori kurang baik, memiliki sitoplasma yang transparan dan tidak merata, kumulus yang mengelilingi oosit tidak rata.
- Oosit *grade D* : Oosit dengan kualitas buruk, memiliki sitoplasma yang transparan hingga terfragmentasi, tidak memiliki kumulus.



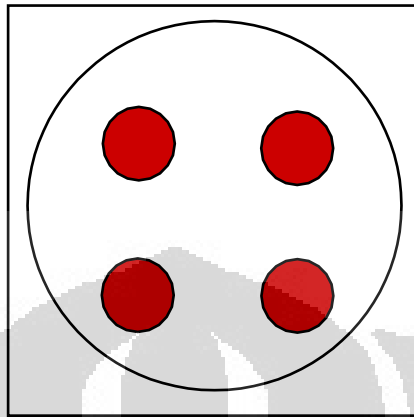
Gambar 5. A. Oosit *grade A*; B. Oosit *grade B*; C. Oosit *grade C*; D. Oosit *grade D*

[Sumber: Alvelar dkk. 2012: 30]

3.5.8 Maturasi Oosit

Oosit yang telah diamati kualitasnya kemudian dipindahkan kedalam medium spot maturasi TCM-199 yang mengandung Calf serum, BSA, dan Glutation untuk dimatangkan, proses ini dinamakan proses maturasi oosit. Komposisi dari medium maturasi secara lengkap ditulis dalam lampiran. Medium spot disiapkan dengan

cara membuat empat spot dari tetesan medium maturasi yang kemudian di lapisi dengan *mineral oil* seperti pada (Gambar 6).



Gambar 6. Spot medium maturasi (IVM)

[Sumber: Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020]

Oosit yang telah dipindahkan ke dalam medium maturasi kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* sebelum kemudian diinkubasi selama minimal 24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 0,5%. Pengamatan yang dilakukan sebelum inkubasi bertujuan untuk mendokumentasikan morfologi oosit sebelum proses maturasi, setelah minimal 24 jam inkubasi, oosit dikeluarkan dari inkubator untuk kemudian diamati morfologi serta ekspansi kumulusnya di bawah mikroskop *inverted*. Hasilnya dibandingkan dengan hasil dokumentasi sebelum oosit diinkubasi (Febretrisiana dkk. 2015: 111; Winangun 2017: 77).

3.5.9 Pengamatan Ekspansi *Cumulus Oophorus*

Ekspansi pada *cumulus oophorus* merupakan salah satu parameter oosit matang setelah maturasi. Pengamatan ekspansi *cumulus oophorus* dilakukan setelah oosit dimaturasi selama minimal 24 jam. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* dan didokumentasikan (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020).

3.5.10 Denudasi Oosit

Denudasi adalah proses melepaskan *cumulus oophorus* dari oosit agar memudahkan pengamatan selanjutnya yaitu pengamatan tingkat kematangan inti oosit. Denudasi dilakukan dengan menarik dan mendorong oosit menggunakan pipet *handling* sampai *cumulus oophorus* terlepas dari oosit (Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020).

3.5.11 Pewarnaan *Hoechst-PI* dan Pengamatan Tingkat Kematangan Inti Oosit

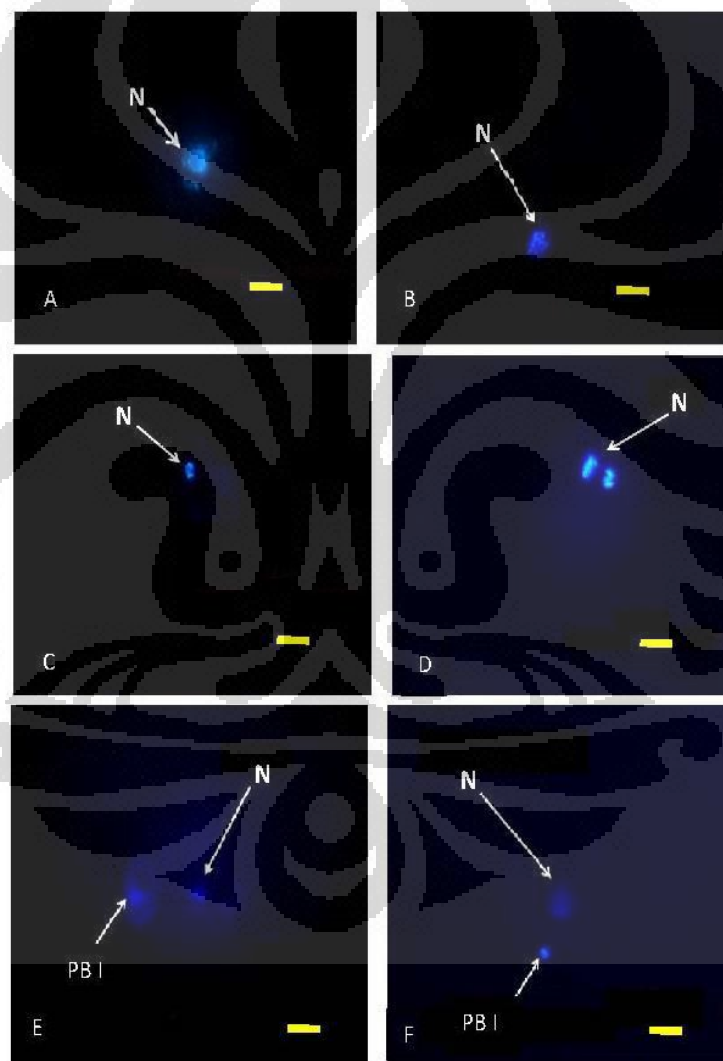
Oosit yang telah didenudasi dan bersih dari *cumulus oophorus* diwarnai dengan menggunakan pewarna *Hoechst* dan *PI* dengan tujuan untuk melihat tingkat kematangan inti oosit dan viabilitas oosit. Oosit yang telah diwarnai diamati dibawah mikroskop fluoresens dan didokumentasikan seperti pada Gambar 6. Klasifikasi tingkat kematangan inti oosit dapat dilihat pada (Tabel 1) (Kaiin dkk. 2018: 76).

Tabel 1. Klasifikasi tingkat kematangan inti oosit (Hafez & Hafez 2000).

Klasifikasi	Deskripsi
<i>Germinal vesicle (GV)</i>	GV (amplop inti sel) masih utuh kromatin tersebar.
<i>Germinal vesicle breakdown (GVBD)</i>	Terjadi kondensasi kromatin menjadi kromosom
Metafase I (M I)	Kromosom berjajar pada spindel meiotik
Metafase II (M II)	Pembelahan meiosis menghasilkan pengurangan jumlah kromosom dan ekspulsi badan polar I
Degenerasi/mati	Konfigurasi abnormal kromosom/kromatin tidak terlihat.

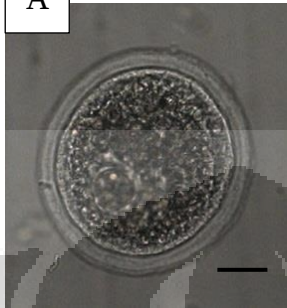
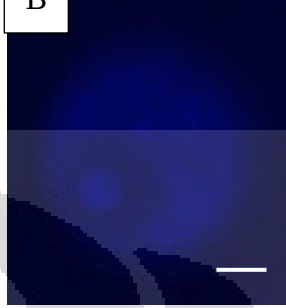
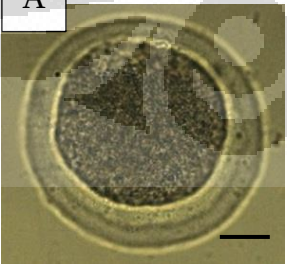
3.5.12 Penambahan Sukrosa dan Pengamatan Pembengkakan Inti Oosit

Oosit yang tingkat kematangan intinya mencapai pada tahap metafase II dipindahkan dan diinkubasi di dalam medium yang mengandung sukrosa selama 5 menit. Waktu inkubasi selama 5 menit mengacu pada pra penelitian yang sebelumnya telah dilakukan. Setelah 5 menit, oosit diamati di bawah mikroskop *inverted* dan mikroskop fluoresent untuk dilihat terjadinya pembengkakan pada inti oosit. Gambar 7 menunjukkan berbagai fase oosit serta pembengkakan inti oosit dan tabel 2 menunjukkan parameter pengamatan pembengkakan inti oosit. (Kaiin dkk. 2018: 78).



Gambar 7. [Gambar berbagai fase oosit. A= *Germinal vesicle*, B= *Metaphase I*, C= *Anaphase I*, D= *Telophase I*, E= *Metaphase II*, and F= *Swollen nucleus oocyte*, dilihat di bawah mikroskop *fluorescence* dengan perbesaran 400x dengan pewarnaan *Hoechst-PI*. PBI= *Polar body I*. N= *Nucleus*.]

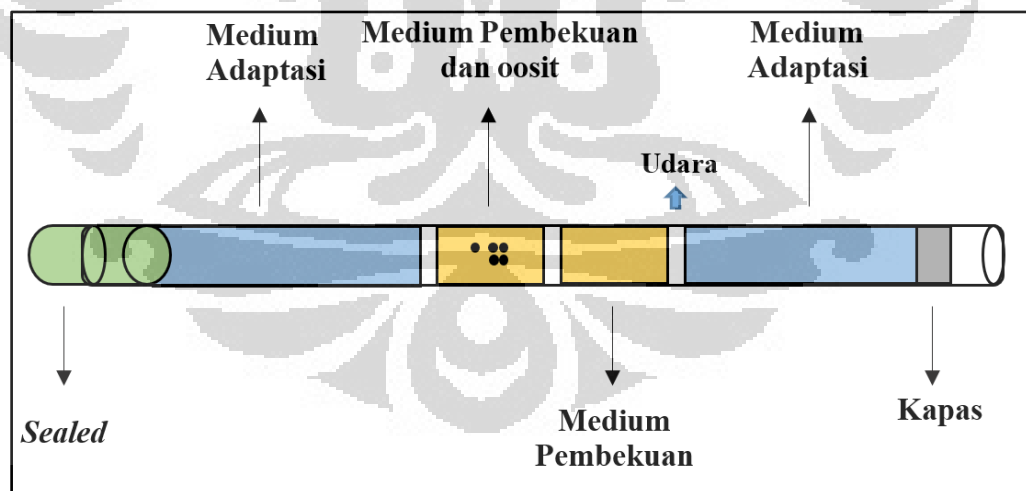
Tabel 2. Parameter pengamatan pembengkakan inti oosit.

No	Status <i>Swollen</i>	Non-filter	Filter DAPI	Keterangan
1	Inti oosit mengalami <i>swollen</i>			Perbesaran 100X <i>Scale bar: 10 μm</i> [Sumber: Dokumentasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020] Ciri-ciri: Terdapat zona kosong di sekitar inti oosit yang merupakan peristiwa <i>swollen</i> inti oosit
2	Inti oosit tidak mengalami <i>swollen</i>			Perbesaran 100X <i>Scale bar: 10 μm</i> [Sumber: Dokumentasi Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan Puslit Bioteknologi LIPI 2020]

				Ciri-ciri: Tidak terdapat zona kosong di sekitar inti oosit ataupun zona bening yang jelas ketika oosit didokumentasikan dengan non-filter
--	--	--	--	---

3.5.13 Kriopreservasi Oosit

Oosit yang telah diamati dipindahkan kedalam medium adaptasi. *Straw* untuk tempat menyimpan oosit dan medium *freezing* yang berisi kryoprotektan sukrosa disiapkan. *Straw* secara berurutan diisi dengan medium adaptasi, medium *freezing* dan oosit, dan medium adaptasi seperti pada (Gambar 8). Komposisi dari medium adaptasi dan medium *freezing* ditulis pada lampiran.



Gambar 8. Urutan medium pembekuan berisikan oosit pada *straw*

[Sumber: Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020]

Nitrogen cair disiapkan di *cryobath* untuk proses pembekuan. *Straw* berisi oosit yang sudah siap dibekukan dimasukkan ke dalam *chamber cryobath* untuk proses

pembekuan yang terprogram selama kurang lebih 1 jam 30 menit. *Straw* berisi oosit yang selesai dibekukan disimpan didalam tabung nitrogen cair (Huong Do dkk. 2017: 60; Latifah 2018: 41).

3.5.14 *Thawing*

Straw yang berisikan oosit dikeluarkan dari tabung nitrogen cair dan dicelupkan kedalam wadah berisi air dengan suhu 35°C, *straw* kemudian diusap secara perlahan-lahan menggunakan jari sampai tidak ada bagian *straw* yang membeku. *Straw* selanjutnya ditegakkan dan diketuk gelembung udaranya secara perlahan hingga gelembung udara mendekati bagian kapas dalam *straw*. *Seal* selanjutnya dibuka dan bagian yang mengandung kapas dalam *straw* digunting. *Straw* yang telah digunting, diletakkan tegak lurus pada kaca arloji agar isi dalam *straw* dapat jatuh pada kaca arloji dengan sempurna. Kaca arloji kemudian diamati di bawah mikroskop stereo [Olympus KL 200] untuk mencari oosit hasil kriopreservasi. Oosit tersebut selanjutnya dipindahkan ke dalam medium adaptasi dan diinkubasi selama kurang lebih 15--30 menit (Winangun dkk. 2017: 77; Lab. RPKSH Puslit Bioteknologi LIPI 2019).

3.5.15 Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data

Metode yang digunakan adalah eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL), penelitian dilakukan dengan inkubasi oosit setelah maturasi dan pascakriopreservasi yang tingkat kematangannya telah mencapai tahap metafase II. Inkubasi dilakukan di dalam medium sukrosa dengan berbagai konsentrasi yaitu 0; 3; 5; dan 5 %. Parameter yang diamati adalah persentase oosit hidup dengan daerah inti yang berhasil membengkak setelah perlakuan pemberian sukrosa.

Data diolah menggunakan SPSS dengan uji Shapiro-Wilk, uji Levene, uji sidik ragam (ANOVA), dan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Uji Shapiro-Wilk dilakukan untuk mengetahui normalitas suatu data dan uji Levene untuk mengetahui homogenasi varian data. Data yang normal dan homogen diuji lebih lanjut menggunakan uji ANOVA satu arah. Data yang tidak normal dan atau tidak homogen diuji menggunakan uji nonparametric Kruskal-Wallis.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Tingkat pembengkakan inti oosit domba garut pascamaturasi

Total oosit yang digunakan dalam penelitian pengaruh sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit domba garut berjumlah 252 oosit. *Swollen* inti oosit dapat dilihat dengan terbentuknya area transparan pada oosit di bagian inti berada.

Hasil statistik pada tabel 3 menunjukkan rata-rata jumlah terjadinya pembengkakan inti oosit pada setiap perlakuan adalah; rata-rata pembengkakan inti oosit setelah maturasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 0% sebesar 0,00%, rata-rata pembengkakan inti oosit setelah maturasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 1% sebesar 25,40%, rata-rata pembengkakan inti oosit setelah maturasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 3% sebesar 58,73%, dan rata-rata pembengkakan inti oosit setelah maturasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 5% sebesar 46,88%.

Pemberian sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi. Hasil tersebut diperoleh berdasarkan uji normalitas Shapiro-Wilk (Lampiran 4; $P < 0,05$), uji homogenitas Levene (Lampiran 5; $P < 0,05$), dan uji Kruskal-Wallis (Lampiran 6; $P < 0,05$). Oosit yang tidak mengalami pembengkakan (*non-swollen*) berdasarkan uji normalitas Shapiro-Wilk (Lampiran 7; $P > 0,05$), uji homogenitas Levene (Lampiran 8; $P > 0,05$), dan uji sidik ragam ANOVA (Lampiran 9; $P < 0,05$) yang berarti menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Dari hasil uji statistik yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah pembengkakan inti oosit paling tinggi terjadi pada pemberian perlakuan konsentrasi sukrosa 3% yakni sebesar 58,73%, dan pemberian sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Tabel 3. Data pembengkakan inti oosit domba garut setelah maturasi

Perlakuan	Total oosit	Inti membengkak [(n±SD(%))]	Inti tidak membengkak [(n±SD(%))]
0%	63	0±0,00(0%) ^a	63±1,97(100%) ^b
1%	63	16±1,03(25,40%) ^b	47±1,17(74,60%) ^a
3%	63	37±0,98(58,73%) ^{cd}	26±1,21(41,27%) ^a
5%	63	29±0,75(46,03%) ^c	34±1,63(53,97%) ^a

4.1.2. Tingkat pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi

Total oosit yang digunakan dalam penelitian pengaruh sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit domba garut pascakriopreservasi berjumlah 192 oosit. Pembengkakan inti oosit dapat dilihat dengan terbentuknya area transparan pada oosit di bagian inti berada.

Hasil statistik pada tabel 4 menunjukkan rata-rata jumlah terjadinya pembengkakan inti oosit pascakriopreservasi pada setiap perlakuan adalah sebagai berikut, rata-rata pembengkakan inti oosit pascakriopreservasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 0% sebesar 0,00%, rata-rata pembengkakan inti oosit pascakriopreservasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 1% sebesar 16,67%, rata-rata pembengkakan inti oosit pascakriopreservasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 3% sebesar 58,33%, dan rata-rata pembengkakan inti oosit pascakriopreservasi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 5% sebesar 39,58%.

Pemberian sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi. Hasil tersebut diperoleh berdasarkan uji normalitas Shapiro-Wilk (Lampiran 10; $P < 0,05$), uji homogenitas Levene (Lampiran 11; $P < 0,05$), dan uji Kruskal-Wallis (Lampiran 12; $P < 0,05$). Oosit yang tidak mengalami pembengkakan (*non-swollen*) berdasarkan uji

normalitas Shapiro-Wilk (Lampiran 13; $P > 0,05$), uji homogenitas Levene (Lampiran 14; $P > 0,05$), dan uji sidik ragam ANOVA (Lampiran 15; $P < 0,05$) yang berarti menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

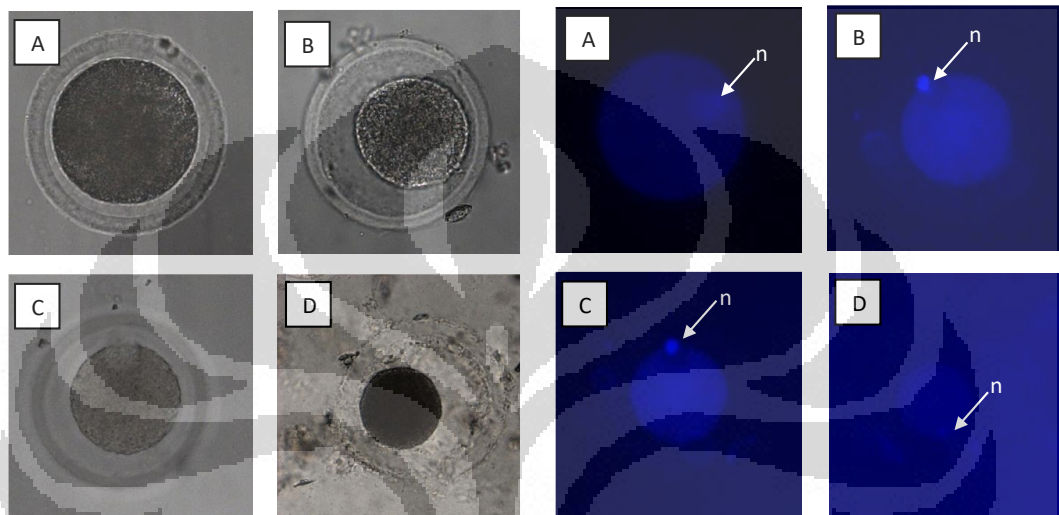
Dari hasil uji statistik yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah pembengkakan inti oosit paling tinggi terjadi pada pemberian perlakuan konsentrasi sukrosa 3% yakni sebesar 58,33%, dan pemberian sukrosa terhadap visualisasi pembengkakan (*swollen*) inti oosit pascakriopreservasi menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Tabel 4. Data pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi

Perlakuan	Total oosit	Inti membengkak [(n±SD(%))]	Inti tidak membengkak [(n±SD(%))]
0%	48	0±0,00(0%) ^a	63±1,79(100%) ^c
1%	48	8±0,52(16,67%) ^b	40±1,21(83,33%) ^b
3%	48	28±1,21(58,33%) ^{cd}	20±0,82(41,67%) ^a
5%	48	19±1,17(39,58%) ^{bc}	29±1,72(60,42%) ^a

4.2. Pembahasan

Berikut merupakan kondisi oosit pada setiap perlakuan (Gambar 9). Disajikan dengan dua model gambar yang didokumentasikan tanpa filter dan dengan filter DAPI pada satu oosit yang sama. Filter DAPI digunakan untuk mengkonfirmasi lokasi inti oosit.



Gambar 9. Kondisi oosit pada setiap perlakuan. A= Oosit pada perlakuan 0%; B= Oosit pada perlakuan 1%; C= Oosit pada perlakuan 3%; D=Oosit pada perlakuan 5%

[Sumber: Lab. Bioteknologi Reproduksi Hewan LIPI 2020]

4.2.1 Pengaruh sukrosa terhadap pembengkakan inti oosit domba garut setelah maturasi

Enukleasi pada tahap awal dari teknik Transfer Inti Sel Somatik (TISS) membutuhkan oosit dengan tingkat kematangan mencapai metafase II (MII) karena teknik ini bergantung pada kondisi sitoplasma yang matang dan tidak dibuahi (Mitalipov dkk 2007). Tidak semua oosit yang dikoleksi tingkat kematangannya mencapai MII, oleh karena itu dilakukan proses maturasi oosit secara *in vitro* untuk mendapatkan lebih banyak oosit dengan tingkat kematangan MII.

Pada tingkat kematangan MII, posisi inti oosit berada didekat Badan Polar I (BPI), namun hasil penelitian Liu dkk (2002) menjelaskan bahwa hanya 31% oosit yang posisi inti oositnya berdekatan dengan BPI. Hal ini bisa menurunkan laju enukleasi karena inti oosit sulit dideteksi. Oleh karena itu, modifikasi pada metode

penelitian ini dilakukan dengan inkubasi oosit di dalam medium sukrosa untuk mempermudah mendeteksi posisi inti oosit di sitoplasma. Sukrosa yang dilarutkan dengan air dapat menjadi larutan yang hipertonis pada kondisi tertentu. Larutan hipertonis adalah jenis larutan yang memiliki konsentrasi yang lebih besar dari zat terlarut di luar sel jika dibandingkan dengan bagian dalam sel. Larutan hipertonis dapat menyebabkan sel mengerut dan menyusut (Campbell dkk. 2004: 110).

Berdasarkan analisis statistik yang telah dilakukan ($P < 0,05$), perlakuan inkubasi dalam medium sukrosa yang diberikan kepada oosit domba garut pada tingkat kematangan MII setelah maturasi memiliki perbedaan nyata antarkonsentrasi. Peningkatan konsentrasi sukrosa 0% -- 3% memberikan hasil peningkatan terjadinya pembengkakan inti oosit domba garut, namun pada konsentrasi sukrosa 5% terjadi penurunan pembengkakan inti oosit. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi sukrosa 3% berhasil menjadi konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit domba garut dimana inti oosit yang mengalami pembengkakan dapat tervisualisasi dengan baik dan mempermudah deteksi posisi inti oosit di dalam sitoplasma. Penelitian sebelumnya melaporkan, bahwa dari konsentrasi sukrosa 10% - 30%, konsentrasi sukrosa 10% menjadi konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit sapi (Liu dkk 2002: 1348). Pada mencit, konsentrasi sukrosa 3% dari 0% - 5% merupakan konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit (Kaiin dkk. 2018: 79). Perbedaan konsentrasi optimum pada setiap penelitian yang telah dilakukan dipengaruhi oleh perbedaan hewan uji yang digunakan untuk penelitian. Perbedaan hewan uji yang digunakan memengaruhi morfologi oosit, sehingga terdapat perbedaan sifat dan karakteristik oosit pada masing-masing jenis hewan. Dari perbedaan tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi sukrosa yang optimum telah berhasil memproyeksikan pembengkakan inti oosit dan konsentrasi sukrosa yang berlebihan akan menyebabkan penurunan keberhasilan terjadinya pembengkakan inti oosit.

Keadaan hipertonis karena pemberian sukrosa dengan konsentrasi optimal dapat membuat oosit mengalami penyusutan dan mengubah konsentrasi protein sitoplasmik. Keadaan ini kemudian menginisiasi perubahan sifat membran dan dinamika sitoskeleton sehingga memunculkan proyeksi dari hasil interaksi antara

filament aktin di permukaan kromosom dan spindel. Proyeksi tersebut berupa pembengkakan yang terjadi di daerah inti oosit yang disebut *nuclear swelling*. Pembengkakan yang terjadi membuat inti oosit lebih mudah terlihat di bawah mikroskop dan dapat meningkatkan keberhasilan dalam enukleasi (Kaiin dkk. 2018: 76).

Pembengkakan inti oosit pada konsentrasi sukrosa 5% mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena terjadinya beberapa kerusakan oosit yang diinkubasi dalam media sukrosa 5%. Kerusakan oosit tersebut meliputi penyusutan sitoplasma dan kerusakan pada ruang privitellina, hal ini dapat memengaruhi proyeksi pembengkakan inti oosit. Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa konsentrasi sukrosa yang berlebihan dapat merusak membran oosit (Kaiin dkk. 2018: 79).

4.2.2 Pengaruh sukrosa terhadap pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi

Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu di bawah -100°C dalam nitrogen cair. Teknik kriopreservasi oosit dilakukan untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel sehingga viabilitas oosit dapat dipertahankan. Oosit yang disimpan pada suhu di bawah -100°C hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme namun masih memiliki kemampuan hidup pada saat digunakan nantinya (Wang dkk. 2001: 432).

Berdasarkan analisis statistik yang telah dilakukan ($P < 0,05$), perlakuan inkubasi dalam medium sukrosa yang diberikan kepada oosit domba garut pada tingkat kematangan MII pascakriopreservasi memiliki perbedaan nyata antarkonsentrasi. Peningkatan konsentrasi sukrosa 0% – 3% memberikan hasil peningkatan terjadinya pembengkakan inti oosit domba garut, namun pada konsentrasi sukrosa 5% terjadi penurunan pembengkakan inti oosit.

Pada penelitian ini, terdapat penurunan tingkat viabilitas oosit domba garut pasca kriopreservasi yang memengaruhi hasil. Tingkat viabilitas pada oosit yang dikriopreservasi dipengaruhi oleh pembentukan kristal es pada proses kriopreservasi *slow freezing*. Sel yang mengalami penurunan suhu secara bertahap pada proses kriopreservasi *slow freezing* dapat membentuk kristal es. Penurunan

suhu secara bertahap menyebabkan sel dapat melewati suhu -5°C yang merupakan suhu kritis terbentuknya kristal es (Widyastuti 2017: 253).

Berdasarkan tabel (Tabel 4), terdapat peningkatan rerata jumlah persentase pembengkakan inti oosit hingga konsentrasi sukrosa 3%, namun pada konsentrasi sukrosa 5% mengalami penurunan. Penurunan persentase pembengkakan inti oosit ialah sebesar 18,75%. Peningkatan persentase menunjukkan bahwa perlakuan inkubasi menggunakan sukrosa memiliki potensi yang baik dalam menginduksi pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi. Penurunan persentase pada konsentrasi sukrosa 5% dalam penelitian, disebabkan oleh pengaruh sukrosa di atas konsentrasi optimum dapat memberikan efek negatif pada sel. Efek negatif tersebut berupa kerusakan oosit yang meliputi penyusutan sitoplasma dan kerusakan pada ruang perivitellina, dan hal ini dapat memengaruhi proyeksi pembengkakan inti oosit. Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa konsentrasi sukrosa yang berlebihan dapat merusak membran oosit (Kaiin dkk. 2018: 79).

Pada penelitian pengaruh sukrosa terhadap pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi dapat dilaporkan bahwa konsentrasi sukrosa 3% berhasil menjadi konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit domba garut pascakriopreservasi. Inti oosit yang mengalami pembengkakan dapat divisualisasi dengan baik dan mempermudah deteksi posisi inti oosit di dalam sitoplasma tanpa memberikan efek negatif terhadap oosit.

BAB 5

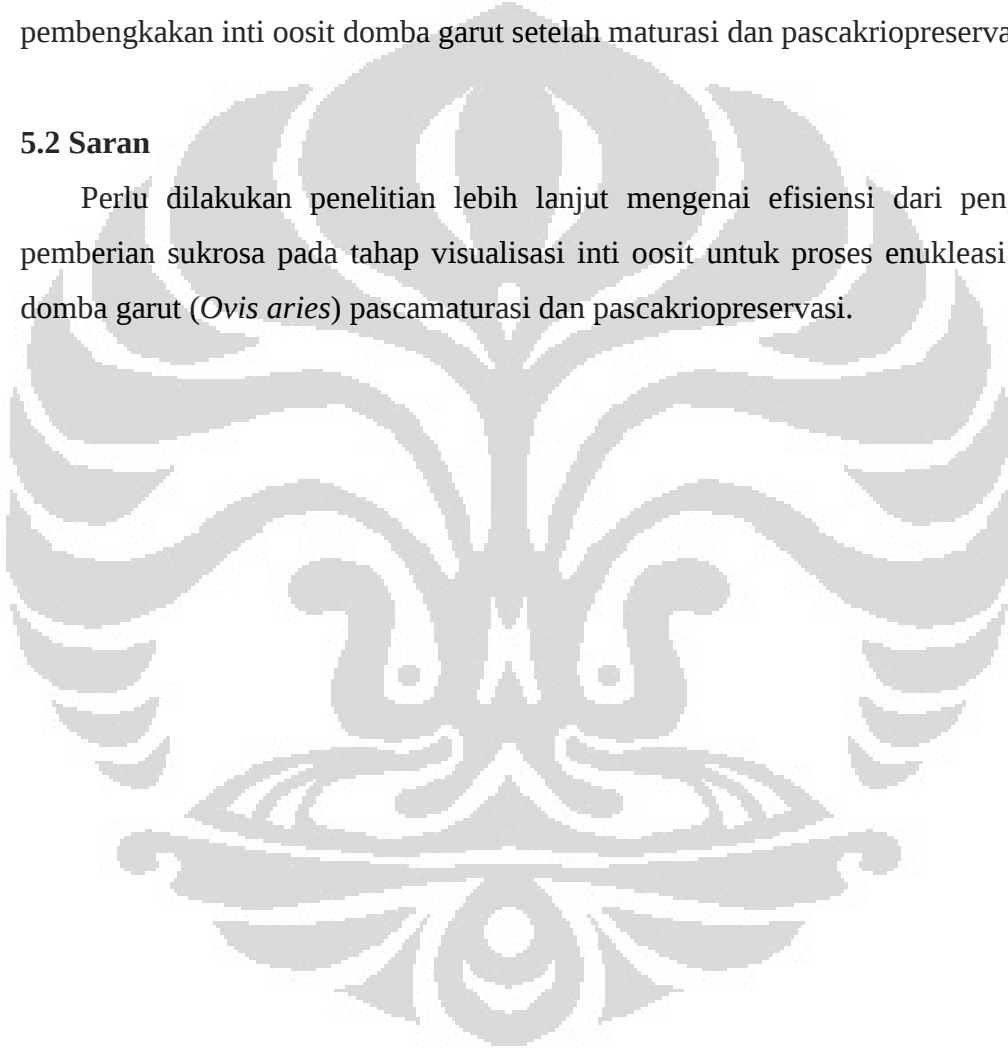
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian sukrosa berpengaruh terhadap visualisasi inti oosit domba garut (*Ovis aries*) pascamaturasi maupun pascakriopreservasi. Pemberian sukrosa dalam penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antarkonsentrasi. Konsentrasi sukrosa 3% menjadi konsentrasi yang optimum untuk menginduksi pembengkakan inti oosit domba garut setelah maturasi dan pascakriopreservasi.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efisiensi dari pengaruh pemberian sukrosa pada tahap visualisasi inti oosit untuk proses enukleasi oosit domba garut (*Ovis aries*) pascamaturasi dan pascakriopreservasi.



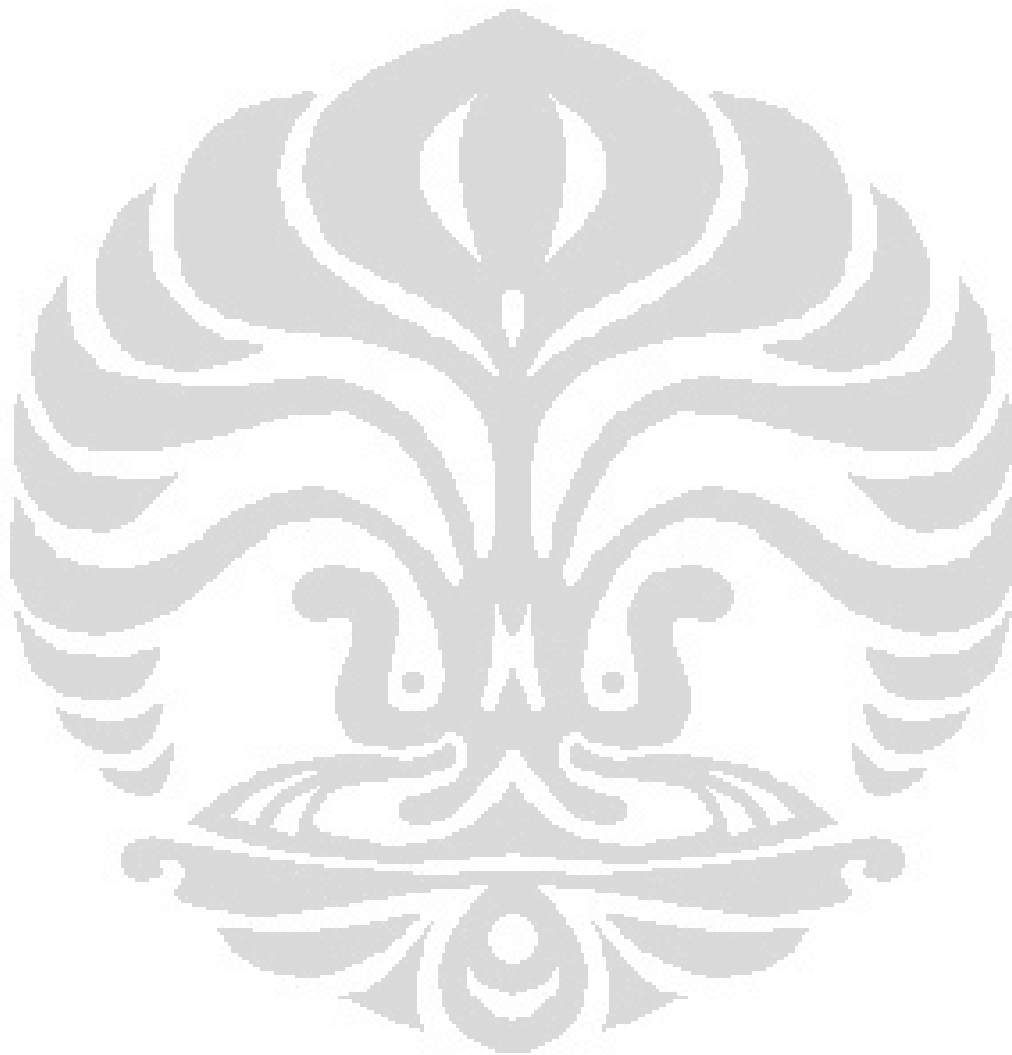
DAFTAR ACUAN

- Alvarenga, F. C. L. & R. R. D. Maziero. 2014. Control of oocyte maturation. *Anim. Reprod.* **11**(3): 150 – 158.
- Anonim. 2019. *Gametogenesis pada hewan dan tumbuhan tingkat tinggi lengkap pengertian, proses, dan gambar.*
<http://www.markijar.com/2019/08/gametogenesis-pada-hewan-dan-tumbuhan.html> diakses pada 5 Maret pukul 5.50 WIB.
- Alvelar, SR. G., R. R. Moura, F. C. Sousa, A. F. Pereira, K. C. Almeida, C. H. S. Melo, A. H. S. Teles-Filho, G. Baril, L. M. Melo, D. I. A. Teixeira & V. J. F. Freitas. 2012. Oocyte production and in vitro maturation in Caninde goats following hormonal ovarian stimulation. *Anim Reprod* **9**(1): 27 – 32.
- Austin, C. R. & R. V. Short. 1982. *Reproduction in mammals*. 1st Ed. University Press. Cambridge: iv + 103 hlm.
- Bhattacharya, S.A. & B.G. Prajapati. 2016. A review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, **10**(3): 1-6.
- Boediono, A., Yulnawati & M. A. Setiadi. 2006. Tingkat pematangan inti oosit domba dari ovarium dengan status reproduksi dan medium maturasi yang berbeda. *Jurnal Hayati* **13**(4): 131 – 136.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, & L. G. Mitchell. 2000. *Biology* 5th ed. Erlangga. Jakarta: ii + 404 hlm.
- Campbell, N. A., J. B. Reece & L. G. Mitchell. 2004. *Biology* 3th ed. Erlangga. Jakarta: ii + 501 hlm.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (DITJEN PKH). 2015. *Domba Garut*. 1 hlm. <http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/content/domba-garut> diakses pada 19 Mei 2020, pk. 22.00 WIB
- Febetrisiana, A., M.A. Setiadi & N.W.K. Kanja. 2015. Tingkat fertilisasi oosit domba dari ovarium yang disimpan pada suhu dan waktu yang berbeda secara *in vitro*. *Jurnal Kedokteran Hewan*, **9**(2): 109--113.
- Fuller, J. B. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*, **25**(6): 375--388.

- Hafez, B. & E. S. E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia: xiii + 509 hlm.
- Hastono, I. Inounu, & N. Hidayati. 2001. *Karakteristik semen dan tingkat libido domba persilangan. Prosiding Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Balai Penelitian Ternak Bogor: 106 – 112 hlm.
- Huong Do, V., S. Walton, S. Catt & A.W.T. Robinson. 2017. A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology*, 77: 58--63.
- Hurk, R., M. M. Bavers, J. F. Beckers. 1997. In vivo and In vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* 47: 73 – 82.
- Isnaeni, W. 2006. *Fisiologi Hewan*. Kanisius. Yogyakarta: 285 hlm.
- ITIS. 2018. *Ovis aries Linnaues*, 1758. 1 hlm. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=552475#null, diakses pada 20 Mei 2020, pk. 09.30 WIB.
- Jang, T.H., S.C. Park, J.H. Yang, J.Y. Kim, J.H. Seok, U.S. Park, C.W. Choi & S.R. Lee. 2017. Cryopreservation on its clinical applications, *Integrative Medicine Research*, 6: 12--18.
- Kaiin, E. M., M. Gunawan, G. Nafisah & M. Madihah. 2018. Influences incubation and sucrose concentration mice (*Mus musculus* L.) oocyte viability for enucleating procedure. *Jurnal Kedokteran Hewan* 12(3): 76 – 80.
- Kementerian Pertanian. 2019. *Pengembangan domba dan kambing menuju ekspor yang berkelanjutan*. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian RI. Malang: 38 hlm.
- Kostaman, T. & A. R. Setioko. 2011. Perkembangan penelitian teknik kriopreservasi untuk menyimpan semen unggas. *Wartazoa* 21(3): 145 – 152.
- Laboratorium Bioteknologi Reproduksi Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, 2020.
- Latifah, A.N. 2018. Pengaruh penambahan antioksidan glutathione dalam medium maturasi oosit domba garut (*Ovis aries*) terhadap kualitas dan viabilitas

- oosit pasca slow freezing. *Skripsi S1-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia*, Depok: xiii + 71 hlm.
- Luso, D., M. Czernik, F. Zacchini, G. Ptak & P. Loi. 2013. Simplified approach for oocyte enucleation in mammalian cloning. *Cellular Reprogramming* **15**(6): 490 – 494.
- Nurahmi, O.D. 2011. Penggolongan morfometrik domba garut, domba ekor gemuk dan domba ekor tipis melalui analisis diskriminan fisher, wald-anderson dan jarak mahalanobis. *Skripsi S1- Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor*, Bogor: iii + 80 hlm.
- Pisestyani, H. 2003. *Kompetensi tingkat kematangan oosit domba yang dimatangkan pada TCM 199 dan MEM EAGLE in vitro*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor: ix + 41 hlm.
- Prihanti, G.S. 2016. *Pengantar Biostatistik*. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang: 321 hlm.
- Senger, P. L. 2012. *Pathways to pregnancy & parturition*. 3rd Ed. Current Conception Inc., Redmond USA: ix + 375 hlm.
- Sumbono, A. 2016. *Biokimia pangan dasar*. Deepublish, Jakarta: xxix + 616 hlm.
- Suprihatin, T. 2008. Korelasi antara oosit domba yang dikoleksi dari rumah pemotongan hewan dengan tingkat fertilitasnya setelah fertilisasi in vitro. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* **16**(2): 27 – 32.
- Wang, M., J. Liu, G. Li, L. Lian & D. Chien. 2000. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* **58**:432 – 436.
- Widyastuti, R., C. Khoirinaya, M. R. Ridlo & M. R. A. A. Syamsunarno. 2017. Perbandingan viabilitas oosit pascavitrifikasi pada dua tingkat konsentrasi sukrosa yang berbeda. *MKB* **49**(4): 252 – 258.
- Wijaya, S. K. 2017. *Status reproduksi domba garut jantan tipe tangkas*. Disertasi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor: vi + 35 hlm.
- Winangun, K., R. Widyastuti & M.R.A.A. Syamsunarno. 2017. Perbandingan viabilitas oosit domba pasca vitrifikasi dengan menggunakan hemistraw dan cryotop. *Jurnal Agripet*, **17**(2): 75--80.

Yamin, M., S. Rahayu & A. Ma'ani. 2013. Kesejahteraan domba akibat pencukuran: tingkah laku domba sebelum, saat, dan setelah pencukuran bulu. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan* 1(1): 15—18.



LAMPIRAN

Lampiran 1

Komposisi Medium

(Lab. RPKSH Puslit Bioteknologi LIPI 2020).

1. Komposisi Medium DPBS Stok

No.	Komposisi	Jumlah
1.	DPBS	9,6 g/L
2.	CaCl ₂	0,1 g
3.	MgCl ₂	0,1 g

Cara membuat:

1. DPBS ditimbang sebanyak 9,6g,
2. DPBS dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL,
3. DPBS dilarutkan dengan akuabides 900 mL di dalam labu erlenmeyer sampai terlarut sempurna,
4. CaCl₂ dan MgCl₂ dilarutkan dengan akuabides 100 mL di dalam labu erlenmeyer,
5. Kedua larutan tersebut dicampur,
6. Mulut labu erlenmeyer ditutup dengan *parafilm* kemudian ditutup dengan *aluminium foil*,
7. Larutan stok yang sudah jadi disimpan di dalam lemari pendingin.

2. Komposisi Medium *Slicing* Stok

No.	Komposisi	Jumlah
1.	DPBS stok	500 mL
2.	<i>Gentamicin</i>	500 μ L
3.	BSA(³ mg/ml)	1,5 g

Cara membuat:

1. Bahan dicampurkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL,
2. Larutkan bahan dengan akuabides kemudian tunggu hingga larut sempurna, medium tidak diaduk,
3. Larutan disterilisasi menggunakan filter 0,22 μ m,
4. Larutan yang sudah disterilisasi dituang ke dalam botol duran dan ditutup.
5. Medium *slicing* stok yang telah jadi disimpan di dalam lemari pendingin dan diberi label.

3. Komposisi Medium *Handling* Stok

No.	Komposisi	Jumlah
1.	DPBS stok	100 mL
2.	<i>Gentamicin</i>	100 μ L
5.	BSA(³ mg/ml)	0,5 g

Cara membuat:

1. Bahan dicampurkan ke dalam labu erlenmeyer 100 mL,
2. Larutkan bahan dengan akuabides kemudian tunggu hingga larut sempurna, medium tidak diaduk,
3. Larutan disterilisasi menggunakan filter 0,22 μ m,
4. Larutan yang sudah disterilisasi dituang ke dalam botol duran

dan ditutup rapat,

5. Medium *handling* stok yang telah jadi disimpan di dalam lemari pendingin dan diberi label.

4. Komposisi Medium Maturasi

No.	Komposisi	Jumlah
1.	TCM-199	9,29 mL
2.	<i>Gentamicin</i>	12,5 µL
3.	FSH	100 µL
4.	hCG	100 µL
5.	Estradiol	10 µL
6.	Sodium Piruvat	10 µL
7.	BSA(³ mg/ml)	0,025 g
8.	Calf Serum	0,5 mL

Cara membuat:

1. Bahan dicampurkan ke dalam labu erlenmeyer 100 mL,
2. Larutkan bahan dengan akuabides kemudian tunggu hingga larut sempurna, medium tidak diaduk,
3. Larutan disterilisasi menggunakan filter 0,22µm,
4. Larutan yang sudah disterilisasi dituang ke dalam botol duran dan ditutup rapat,
5. Medium maturasi yang telah jadi disimpan di dalam lemari pendingin dan diberi label.

5. Komposisi Medium Adaptasi

No.	Komposisi	Jumlah
1.	DPBS stok	10 mL
2.	<i>Gentamicin</i>	10 µL

5.	<i>Bovine Serum Albumin 0,4%</i>	0,04 g
----	----------------------------------	--------

Cara membuat:

1. Sebanyak 10 μL Gentamicin dimasukkan ke dalam larutan DPBS.
2. BSA FAF 0,4% sebanyak 0,04 gram kemudian ditambahkan dan ditunggu hingga larut.
3. Medium adaptasi selanjutnya disaring menggunakan mikrofilter 0,22 μm .

6. Komposisi Medium Freezing

No.	Komposisi	Jumlah
1.	DPBS stok	25 mL
2.	<i>Bovine Serum Albumin 0,4%</i>	0,10 g
3.	Etilen Glikol 10%	2,5 mL
4.	Sukrosa (0,1 M)	0,855 g
5.	Gentamicin	25 μL

Cara membuat:

1. Sebanyak 25 μL Gentamicin dan 0,855 gram sukrosa 0,1 M dimasukkan dalam 24475 μL larutan DPBS.
2. Sebanyak 0,10 gram BSA FAF 0,4 % kemudian ditambahkan dan ditunggu hingga larut.
3. Setelah larut, 2500 μL etilen glikol ditambahkan dan ditunggu hingga 10 menit dan disaring menggunakan mikrofilter 0,22 μm .

Data *Swollen* dan *Non-Swollen* Inti Oosit Domba Garut

Setelah Pematangan

Perlakuan	Koleksi Ovarium	Total Oosit	<i>Swollen</i>		<i>Non-Swollen</i>	
			n	%	n	%
0%	1	12	0	0.00	12	100.00
	2	7	0	0.00	7	100.00
	3	10	0	0.00	10	100.00
	4	10	0	0.00	10	100.00
	5	12	0	0.00	12	100.00
	6	12	0	0.00	12	100.00
	Σ	63	0	0.00	63	100.00
	Rerata	10.50	0.00	0.00	10.50	100.00
1%	SD	1.97	0.00	0.00	1.97	0.00
	1	9	2	22.22	7	77.78
	2	13	3	23.08	10	76.92
	3	12	4	33.33	8	66.67
	4	11	3	27.27	8	72.73
	5	10	3	30.00	7	70.00
	6	8	1	12.50	7	87.50
	Σ	63	16	25.40	47	74.60
3%	Rerata	10.50	2.67	24.73	7.83	75.27
	SD	1.87	1.03	7.31	1.17	7.31
	1	12	7	58.33	5	41.67
	2	9	6	66.67	3	33.33
	3	12	7	58.33	5	41.67
	4	9	5	55.56	4	44.44
	5	8	5	62.50	3	37.50
	6	13	7	53.85	6	46.15
5%	Σ	63	37	58.73	26	41.27
	Rerata	10.50	6.17	59.21	4.33	40.79
	SD	2.07	0.98	4.69	1.21	4.69
	1	12	6	50.00	6	50.00
	2	8	5	62.50	3	37.50
	3	12	4	33.33	8	66.67
	4	10	4	40.00	6	60.00
	5	11	5	45.45	6	54.55
	6	10	5	50.00	5	50.00
	Σ	63	29	46.03	34	53.97
	Rerata	10.50	4.83	46.88	5.67	53.12
	SD	1.52	0.75	9.96	1.63	9.96

Perlakuan	Koleksi <i>thawing</i>	Total Oosit	Swollen		Non-Swollen	
			n	%	n	%
0%	1	8	0	0.00	8	100.00
	2	10	0	0.00	10	100.00
	3	10	0	0.00	10	100.00
	4	8	0	0.00	8	100.00
	5	6	0	0.00	6	100.00
	6	6	0	0.00	6	100.00
	Σ	48	0	0.00	48	100.00
	Rerata	8.00	0.00	0.00	8.00	100.00
1%	SD	1.79	0.00	0.00	1.79	0.00
	1	8	2	25.00	6	75.00
	2	9	1	11.11	8	88.89
	3	9	1	11.11	8	88.89
	4	9	2	22.22	7	77.78
	5	7	1	14.29	6	85.71
	6	6	1	16.67	5	83.33
	Σ	48	8	16.67	40	83.33
3%	Rerata	8.00	1.33	16.73	6.67	83.27
	SD	1.26	0.52	5.79	1.21	5.79
	1	8	5	62.50	3	37.50
	2	8	4	50.00	4	50.00
	3	6	4	66.67	2	33.33
	4	10	6	60.00	4	40.00
	5	6	3	50.00	3	50.00
	6	10	6	60.00	4	40.00
5%	Σ	48	28	58.33	20	41.67
	Rerata	8.00	4.67	58.19	3.33	41.81
	SD	1.79	1.21	6.80	0.82	6.80
	1	7	3	42.86	4	57.14
	2	9	4	44.44	5	55.56
	3	7	4	57.14	3	42.86
	4	5	1	20.00	4	80.00
	5	12	4	33.33	8	66.67
	6	8	3	37.50	5	62.50
	Σ	48	19	39.58	29	60.42
	Rerata	8.00	3.17	39.21	4.83	60.79
	SD	2.37	1.17	12.40	1.72	12.40

Lampiran 4

Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap *Swollen*
Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui persebaran data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi secara normal.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi tidak normal.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Normality

Shapiro-Wilk			
<i>Swollen</i>	Statistik	df	P
Nilai	0,892	24	0,014

$P > 0,050$; **0,014 < 0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi tidak normal.

Lampiran 5

Uji Homogenitas Levene terhadap *Swollen*
Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui homogenitas variansi data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang homogen.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak. Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Homogeneity of Variance

		Levene		
Swollen	Statistik	df1	df2	P
Nilai	5,184	3	20	0,008

$P > 0,050$; **0,008** < **0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Lampiran 6

Uji Non-Parametrik Kruskal Wallis terhadap Data
Swollen Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui tingkat perbedaan nyata data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi, tidak menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Statistics

Kruskal-Wallis			
<i>Swollen</i>	Chi-Square	df	P
Nilai	20,827	3	0,000

$P > 0,050$; **0,000 < 0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi

Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap *Non-swollen* Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui persebaran data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi secara normal.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi tidak normal.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Normality

Shapiro-Wilk			
<i>Non-swollen</i>	Statistik	df	P
Nilai	0,935	24	0,128

$P > 0,050$; **0,128 > 0,050**; maka H_0 diterima.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi terdistribusi normal.

Uji Homogenitas Levene terhadap *Non-Swollen*

Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui homogenitas variansi data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang homogen.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak. Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Homogeneity of Variance

		Levene		
<i>Non-swollen</i>	Statistik	df1	df2	P
Nilai	0,605	3	20	0,620

$P > 0,050$; **0,620** > **0,050**; maka H_0 diterima.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan variansi data yang homogen.

Uji Sidik Ragam (ANOVA) terhadap Data *Non-swollen* Inti Oosit Domba Garut setelah Maturasi

Tujuan:

Mengetahui tingkat perbedaan nyata data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi, tidak menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

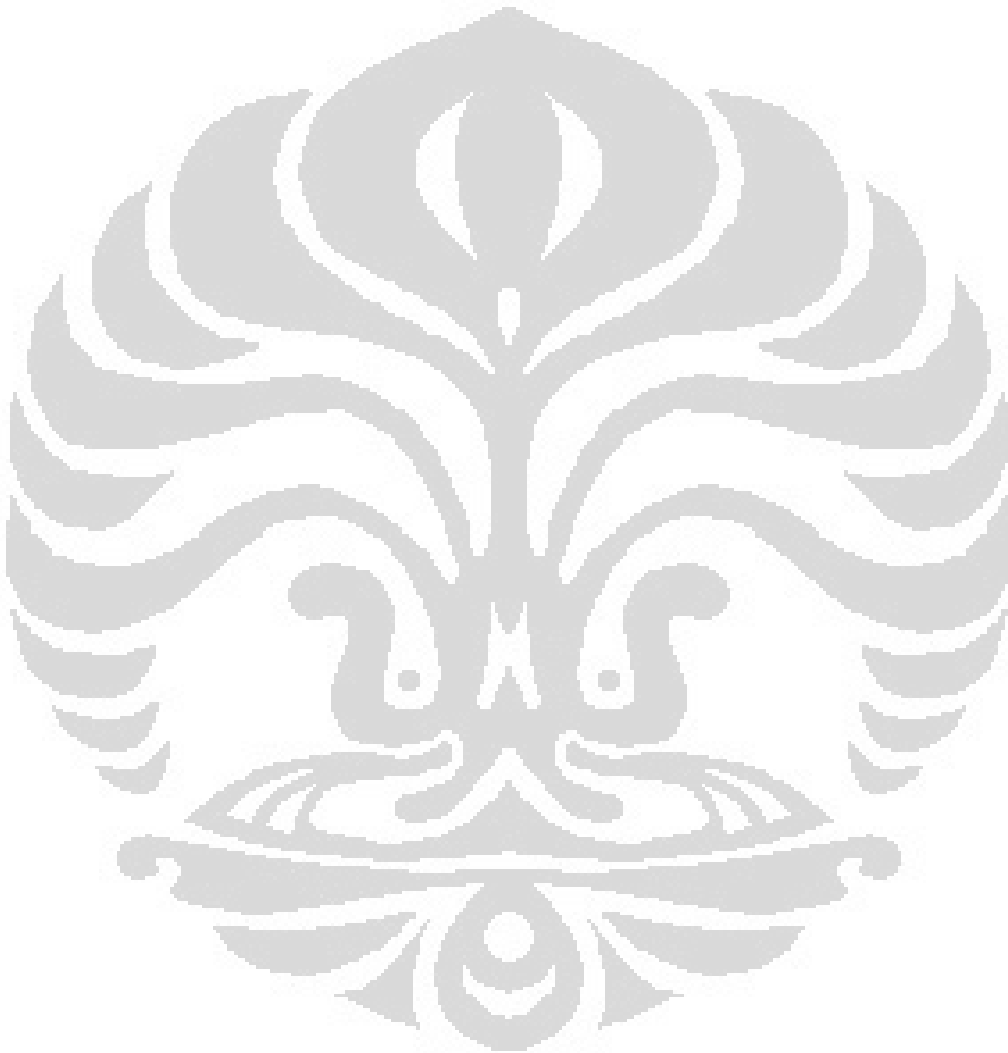
Test of ANOVA

ANOVA					
Nilai	Jumlah kuadrat	df	Rerata Kuadrat	F	P
Antar Kelompok	130,833	3	43,611	18,558	0,000
Dalam Kelompok	47,000	20	2,350		
Total	177,833	23			

$P > 0,050$; $0,000 < 0,050$; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut setelah maturasi menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi



Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap *Swollen*
Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui persebaran data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi secara normal.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi tidak normal.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Normality

		Shapiro-Wilk	
<i>Swollen</i>	Statistik	df	P
Nilai	0,894	24	0,016

$P > 0,050$; **0,016 < 0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi tidak normal.

Lampiran 11

Uji Homogenitas Levene terhadap
Swollen Inti Oosit Domba Garut

Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui homogenitas variansi data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang homogen.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak. Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Homogeneity of Variance

		Levene		
<i>Non-swollen</i>	Statistik	df1	df2	P
Nilai	3,737	3	20	0,005

$P > 0,050$; **0,005** < **0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Universitas Indonesia

Uji Non-Parametrik Kruskal Wallis terhadap Data
Swollen Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui tingkat perbedaan nyata data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, tidak menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

H_a : Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Statistics

Kruskal-Wallis			
<i>Swollen</i>	Chi-Square	df	P
Nilai	19,908	3	0,000

$P > 0,050$; **0,000** < **0,050**; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Uji Normalitas Saphiro-Wilk terhadap *Non-swollen*
Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui persebaran data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi secara normal.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi tidak normal.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Normality

		Shapiro-Wilk	
<i>Non-swollen</i>	Statistik	df	P
Nilai	0,932	24	0,107

$P > 0,050$; **0,107** > **0,050**; maka H_0 diterima.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi terdistribusi normal.

Uji Homogenitas Levene terhadap *Non-Swollen*

Inti Oosit Domba Garut Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui homogenitas variansi data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang homogen.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang tidak homogen.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak. Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of Homogeneity of Variance

Levene				
<i>Non-swollen</i>	Statistik	df1	df2	P
Nilai	0,757	3	20	0,531

$P > 0,050$; **0,531** > **0,050**; maka H_0 diterima.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi menunjukkan variansi data yang homogen.

Uji Sidik Ragam (ANOVA) terhadap Data *Non-swollen* Inti Oosit
Domba Garut Pascakriopreservasi

Tujuan:

Mengetahui tingkat perbedaan nyata data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi.

Hipotesis:

H_0 : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, tidak menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

H_a : Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi.

Taraf Nyata:

Nilai α yang digunakan ialah 0,050 ($\alpha = 0,050$)

Pengambilan Keputusan:

Jika $P \leq 0,050$; maka H_0 ditolak.

Jika $P > 0,050$; maka H_0 diterima

Hasil Perhitungan:

Test of ANOVA

ANOVA					
Nilai	Jumlah kuadrat	df	Rerata Kuadrat	F	P
Antar Kelompok	77,333	3	25,778	12,275	0,000
Dalam Kelompok	44,000	20	2,100		
Total	119,333	23			

$P > 0,050$; $0,000 < 0,050$; maka H_0 ditolak.

Kesimpulan:

Data *non-swollen* inti oosit domba garut pascakriopreservasi, menunjukkan perbedaan nyata antarkonsentrasi

