



@Hak cipta milik IPB University

**PERKEMBANGAN EMBRIO PARTENOGENETIK MENCIT
YANG DIKULTUR PADA CHIR99021 SEBAGAI SUMBER
KOLONI PRIMER *PARTHENOGENETIC EMBRYONIC STEM
CELLS* (pESC)**

DWI BUDIONO



**PROGRAM STUDI ILMU-ILMU FAAL DAN KHASIAT OBAT
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**



@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA*

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul “Perkembangan Embrio Partenogenetik Mencit yang Dikultur pada CHIR99021 sebagai Sumber Koloni Primer *Parthenogenetic Embryonic Stem Cells* (pESC)” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 2021

Dwi Budiono
NIM B161160098

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

RINGKASAN

DWI BUDIONO. Perkembangan Embrio Partenogenetik Mencit yang Dikultur pada CHIR99021 sebagai Sumber Koloni Primer *Parthenogenetic Embryonic Stem Cells* (pESC). Dibimbing oleh ARIEF BOEDIONO, MOKHAMAD FAHRUDIN, dan NI LUH PUTU IKA MAYASARI.

Parthenogenetic embryonic stem cell (pESC) merupakan sel punca (*stem cell*) yang berasal dari *inner cell mass* (ICM) embrio partenogenetik fase blastosis. Kelebihan *stem cell* ini dibandingkan dengan *stem cell* lainnya adalah sifat pluripotensi dan *self renewal* yang baik. Kendala kultur pESC adalah kemampuan embrio partenogenetik untuk membentuk blastosis masih rendah. Selain itu, blastosis partenogenetik yang dihasilkan memiliki kualitas yang rendah. Hal ini tentunya memengaruhi efektivitas kultur koloni primer dan *cell line* dari pESC.

Tujuan penelitian ini melakukan produksi blastosis partenogenetik dengan penambahan CHIR99021 sebagai inhibitor *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) yang berkaitan dengan mekanisme aktivasi jalur *Wnt/β-catenin*. Tujuan kedua adalah membandingkan kuantitas dan kualitas blastosis partenogenetik yang dikultur pada CHIR99021 dengan konsentrasi 0 μM, 3 μM, dan 10 μM. Tujuan ketiga adalah melakukan kuantifikasi terhadap sekretom *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *epidermal growth factor* (EGF), dan *insulin like growth factor 1* (IGF1) yang dihasilkan oleh sel *rat embryonic fibroblast* (REF) pada pasase 3, 10, dan 16. Tujuan keempat adalah menganalisis kemampuan blastosis partenogenetik yang dihasilkan dari kultur yang menggunakan CHIR99021 sebagai sumber koloni primer pESC. Tujuan kelima adalah menganalisis kualitas dan pluripotensi koloni primer pESC mencit yang dihasilkan. Tujuan keenam adalah menganalisis kemampuan koloni pimer pESC yang dihasilkan untuk berdiferensiasi menjadi sel somatis.

Mencit betina berusia 3 bulan disuperovulasi menggunakan penyuntikan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (HCG). Sebagian dari mencit yang disuperovulasi dikawinkan dengan pejantan dan sisanya dibiarkan tanpa perkawinan. Oosit mencit dikoleksi 14 jam pascapenyuntikan HCG. Oosit yang dikoleksi kemudian diaktivasi menggunakan medium yang mengandung strontium klorida (SrCl₂) 10 mmol/l dan sitokalsin B 5 μg/ml. Zigot partenogenetik kemudian dikelompokkan menjadi 3 berdasarkan medium kulturnya (kelompok CHIR99021 0 μM, CHIR99021 3 μM, dan CHIR99021 10 μM). Zigot hasil fertilisasi digunakan sebagai kontrol positif. Kultur dilakukan selam 4 hari.

Sel REF dihasilkan dari metode kultur eksplan. *Conditioned medium* (CM) sel REF pasase 3, 10, dan 16 dikoleksi kemudian dilakukan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mengukur konsentrasi bFGF, EGF, dan IGF1. Tingkat pasase sel REF dengan nilai sekretom terbaik akan digunakan sebagai *feeder cell* pada kultur koloni primer pESC.

Blastosis kelompok kontrol, CHIR99021 0 μM, dan CHIR99021 3 μM kemudian dikultur menggunakan *feeder cell* REF. Kelompok CHIR99021 10 μM tidak digunakan sebagai sumber koloni primer pESC karena memiliki kualitas yang tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok CHIR99021 0 μM dan lebih rendah dari kelompok CHIR99021 3 μM. Koloni primer dikarakterisasi dengan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

metode pewarnaan imunositokimia menggunakan antibodi anti-*Nanog*, *Oct4*, dan *SSEA1*. Selain itu, karakterisasi juga dilakukan menggunakan pewarnaan terhadap *alkaline phosphatase* (ALP). Koloni primer didiferensiasikan dengan cara memperpanjang masa kultur tanpa menggunakan *leukemia inhibitory factor* (LIF). Diferensiasi dilakukan selama 14 hari.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivasi partenogenesis menghasilkan zigot partenogenetik diploid yang ditandai dengan 2 pronukleus. Senyawa CHIR99021 3 μM mampu meningkatkan pembentukan blastosis partenogenetik secara nyata ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Kualitas blastosis yang dihasilkan juga meningkat secara nyata ($p < 0,05$). Tingkat pembentukan dan kualitas blastosis partenogenetik mengalami penurunan ($p < 0,05$) karena peningkatan CHIR99021 menjadi 10 μM . Sekresi *growth factor* bFGF sel REF pasase 10 dan 16 lebih tinggi ($p < 0,05$) dari pasase 3. Sel REF pasase 16 mensekresi EGF paling tinggi dibandingkan pasase 3 dan 10 ($p < 0,05$). Konsentrasi IGF1 yang dihasilkan oleh sel REF pada semua tingkat pasase tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Kelompok CHIR99021 3 μM mampu menghasilkan nilai AR dan PR yang tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$). Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan mengekspresikan *Nanog*, *Oct4*, dan *SSEA1*. Kelompok CHIR99021 3 μM mengekspresikan ALP paling baik. Hasil diferensiasi menunjukkan bahwa semua kelompok mampu membentuk *embryoid body-like*, sel-sel *neuronal*, dan sel-sel glia. Sel *cardiomyocyte-like* hanya terbentuk pada kelompok CHIR99021 3 μM .

Simpulan dari penelitian dalam disertasi ini adalah penambahan CHIR99021 3 μM dalam media kultur memberikan hasil peningkatan *blastocyst rate* yang efisien. Penambahan CHIR99021 sebanyak 3 μM pada medium kultur mampu meningkatkan kualitas blastosis partenogenetik yang dihasilkan. Sel REF pasase 16 menghasilkan bFGF dan EGF yang cukup tinggi untuk mendukung kultur koloni primer pESC. Blastosis partenogenetik yang dikultur menggunakan CHIR99021 3 μM mampu menghasilkan koloni primer yang sama baiknya dengan blastosis fertilisasi. Koloni primer pESC yang dihasilkan mengekspresikan pluripotensi yang baik dan mampu berdiferensiasi menjadi *embryoid body like*, sel-sel neural, dan sel-sel *cardiomyocyte-like*.

Kata kunci: blastosis, CHIR99021, *embryonic stem cells*, koloni primer, partenogenetik, *rat embryonic fibroblast*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

DWI BUDIONO. Development of Mice Parthenogenetic Embryos Cultured at CHIR99021 as a Source of Primary Colonies of Parthenogenetic Embryonic Stem Cells (pESC). Supervised by ARIEF BOEDIONO, MOKHAMAD FAHRUDIN, and NI LUH PUTU IKA MAYASARI.

Parthenogenetic embryonic stem cells (pESC) are stem cells derived from the inner cell mass (ICM) of the blastocyst phase of parthenogenetic embryo. The advantages of this stem cell compared to other stem cells are its pluripotent and self renewal properties. The obstacle of pESC culture is blastocyst rate of parthenogenetic embryo is still low. In addition, the resulting parthenogenetic blastocysts are of poor quality. This low quality of blastocysts eventually affects the effectivity of the primary colony culture of pESC.

The objective of this study was to produce parthenogenetic blastocysts with the addition of CHIR99021 as a glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor associated with the activation mechanism of the Wnt/ β -catenin pathway. The second objective was to compare the quantity and quality of parthenogenetic blastocysts cultured on CHIR99021 at concentrations of 0 μ M, 3 μ M, and 10 μ M. The third objective was to quantify basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), and insulin like growth factor 1 (IGF1) produced by rat embryonic fibroblast (REF) in passages 3, 10, and 16. The fourth objective was to analyze the ability of parthenogenetic blastocysts produced from cultures using CHIR99021 as the source of pESC primary colonies. The fifth objective was to analyze the quality and pluripotency of the primary colonies of mice pESC produced. The sixth objective was to analyze the ability of the pESC primary colonies to differentiate into somatic cells.

The three months old female mice were superovulated. Some of the superovulated mice were mated with males and the others were left without mating. The mice oocytes were collected 14 hours after HCG injection then activated using a medium containing 10 mmol of SrCl₂ and 5 μ g/ml of cytochalasin B. The parthenogenetic zygotes were then classified into 3 groups based on the culture medium used (group CHIR99021 0 μ M, CHIR99021 3 μ M, and CHIR99021 10 μ M). Fertilized zygote was used as a positive control. Culture was carried out for 4 days.

REF cells were produced using the explant culture method. Conditioned medium from REF cells of passage 3, 10, and 16 were collected then ELISA was performed on bFGF, EGF, and IGF1. The passage level of REF cells with the best secretome values will be used as feeder cells in pESC primary colony cultures.

Blastocysts from control group, CHIR99021 0 μ M group, and CHIR99021 3 μ M group were then cultured using feeder cells REF. The CHIR99021 10 μ M group was not used as a source of pESC primary colonies because it had a quality that was not significantly different from the CHIR99021 0 μ M group and was lower than the CHIR99021 3 μ M group. Primary colonies were characterized by immunocytochemical staining method using anti-Nanog, Oct4, and SSEA1 antibodies. In addition, characterization was also carried out using alkaline phosphatase (ALP) staining. Primary colonies were differentiated by extending the culture period without using LIF.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

The results of this study indicated that activation of parthenogenesis produces a diploid parthenogenetic zygote characterized by 2 pronuclei. CHIR99021 3 μM was able to significantly increase the formation of parthenogenetic blastocysts ($p < 0,05$) when compared to other treatment groups. The quality of blastocysts produced also significantly improved ($p < 0,05$). The formation rate and quality of parthenogenetic blastocysts were decreased ($p < 0,05$) due to the increase in CHIR99021 to 10 μM . The secretion of bFGF in REF cells passage 10 and 16 were higher ($p < 0,05$) than in cells passage 3. REF cells passage 16 secreted the highest EGF compared to REF cells passage 3 and 10 ($p < 0,05$). The concentration of IGF1 produced by REF cells at all levels of passage was not significantly different ($p > 0,05$).

CHIR99021 3 μM group was able to produce AR and PR values that were not significantly different from the control group ($p > 0,05$). The characterization results showed that all treatment groups expressed Nanog, Oct4, SSEA1. The CHIR99021 3 μM group expressed the best ALP. The differentiation results showed that all groups were able to form embryoid body-like, neuronal cells, and glial cells. Cardiomyocyte-like cells only formed from the CHIR99021 3 μM group. The conclusion from the research in this dissertation is that the addition of CHIR99021 3 μM in the culture medium resulted an efficient increase in the blastocyst rate. The quality of the parthenogenetic blastocysts produced by the culture system is improved. The REF cells passage 16 produce high enough bFGF and EGF to support pESC. Parthenogenetic blastocysts cultured using CHIR99021 3 μM were able to produce primary colonies as well as fertilized blastocysts. The resulting pESC primary colony expresses good pluripotency and is able to differentiate into embryoid body-like, neural cells, and cardiomyocyte-like cells.

Keywords: blastocyst, CHIR99021, embryonic stem cells, parthenogenetic, primary colonies, rat embryonic fibroblasts

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2021

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



**PERKEMBANGAN EMBRIO PARTENOGENETIK MENCIT
YANG DIKULTUR PADA CHIR99021 SEBAGAI SUMBER
KOLONI PRIMER *PARTHENOGENETIC EMBRYONIC STEM
CELLS* (pESC)**

DWI BUDIONO

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Ilmu-ilmu Faal dan Khasiat Obat

**PROGRAM STUDI ILMU-ILMU FAAL DAN KHASIAT OBAT
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**BOGOR
2021**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity

Penguji pada Ujian Tertutup:

1. Prof. Drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P, Ph.D
2. Dr. Drh. Hera Maheshwari, M.Sc

Penguji pada Ujian Terbuka:

1. Prof. Drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P, Ph.D
2. Dr. Harry Murti, S.Si

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Judul Disertasi: Perkembangan Embrio Partenogenetik Mencit yang Dikultur pada CHIR99021 sebagai Sumber Koloni Primer *Parthenogenetic Embryonic Stem Cells* (pESC)

Nama : Dwi Budiono

NIM : B161160098

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Drh. Arief Boediono, Ph.D, PA.Vet (K)



Pembimbing 2:
Drh. Mokhamad Fahrudin, Ph.D, PA.Vet (K)



Pembimbing 3:
Dr. Drh. Ni Luh Putu Ika Mayasari



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof Ir Wasmen Manalu, PhD
NIP. 195712201983121001



Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof Dr Ir Anas Miftah Fauzzi, MEng
NIP. 196004191985031002



Tanggal Ujian : 21 Juni 2021

Tanggal Lulus : 19 Juli 2021

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan April 2018 ini ialah *parthenogenetic embryonic stem cells*, dengan judul Perkembangan Embrio Partenogenetik Mencit yang Dikultur pada CHIR99021 sebagai Sumber Koloni Primer *Parthenogenetic Embryonic Stem Cells* (pESC).

Alhamdulillah rabbil 'alamin penulis ucapkan kepada Allah SWT. Selama penulisan disertasi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah memberikan dukungan. Dukungan tersebut berupa moril dan materi sehingga tulisan ini dapat diselesaikan. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof Drh Arief Boediono, PhD, PAVet (K) yang telah membimbing dan menjadi promotor penulis dalam program beasiswa Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU). Terima kasih atas kepercayaan, bimbingan, dan arahan yang telah beliau berikan selama program Doktor berlangsung.
2. Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui program beasiswa Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) yang telah memberikan biaya untuk studi dan penelitian sehingga penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan sampai ke tahap Doktor.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang telah memberikan bantuan berupa fasilitas penelitian.
4. Drh Mokhamad Fahrudin, PhD, PAVet (K) dan Dr Drh Ni Luh Putu Ika Mayasari selaku komisi pembimbing. Terima kasih atas bimbingan dan arahnya selama proses program Doktor ini.
5. Bapak Sukiman dan Almarhumah Ibu Sulasmi selaku Ayah dan Ibu Penulis. Terima kasih telah merawat, membesarkan, dan mendidik penulis dengan baik.
6. Drh Putri Ekandini dan Hadyan Adhinatha Budiono selaku Isteri dan Anak. Terima kasih telah hadir dalam kehidupan penulis.
7. Almarhum Bapak Yudhi Rhahadian dan Ibu Leni Nuraeni selaku Bapak dan Ibu mertua.
8. Ibu Ratih Rinendyaputri, M.Biomed dan Ibu Ariyani Noviantari, SSi, M.Biomed selaku penanggung jawab Laboratorium Sel Punca, Badan Penelitian dan Pengembangan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Terima kasih telah banyak membantu baik secara moril ataupun materil selama proses penelitian.
9. Almarhumah Dr Drh Ita Djuwita, Mphil, PAVet (K), Dr Drh Koesdiantoro Mohamad, MSi, PAVet, Dr Drh Wahono Esthi Prasetyaningtyas, MSi, PAVet atas semua arahnya.
10. Dr Drh Aryani Sismin Satyaningtijas, MSc, AIF dan Dr Drh Gunanti, MS yang telah banyak membimbing selama penulis berkuliah di IPB.
11. Prof Ir Wasmen Manalu, PhD, AIF, atas segala arahan dan bimbingannya.
12. Dr Berry Juliandi, Ssi, MSi selaku Penguji pada Prelim Lisan, Prof Drh Ni Wayan Kurniani Karja, MP, PhD dan Dr Drh Hera Maheshwari, MSc

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

- selaku penguji pada ujian tertutup
13. Prof Drh Ni Wayan Kurniani Karja, MP, PhD dan Dr Harry Murti, SSI selaku penguji pada sidang promosi.
 14. Dr Ir Arief Daryanto, DipAgEc, MEc selaku Dekan Sekolah Vokasi IPB, Dr Ir Bagus Priyo Purwanto, MAgr selaku Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Sekolah Vokasi IPB, Dr Ir Wawan Oktariza, MSi selaku Wakil Dekan Bidang Sumber Daya, Kerja Sama, dan Pengembangan Sekolah Vokasi IPB.
 15. Drh Henny Endah Anggraeni, MSc selaku Ketua Program Studi Paramedik Veteriner Sekolah Vokasi IPB, Drh Surya Kusuma Wijaya, MSi selaku Sekretaris Program Studi Paramedik Veteriner Sekolah Vokasi IPB, Dr Drh Erni Sulistiawati, SP1, Drh Heryudianto Vibowo, MSi, Drh Tetty Barunawati Siagian, MSi dan Dr Drh Desrayni Hanadhita, MSi selaku Dosen Kolega pada Program Studi Paramedik Veteriner Sekolah Vokasi IPB.
 16. Dr Noer Mohamad Dliaul Haq, SSI, MSi, Drh Diah Nugrahani Pristihadi, MSi, Dr Drh Vista Budiariati, MSi, Drh Handina R, MSi, Drh Elpita Tarigan, MSi, Dr Nuril Farizah, Drh Alif Iman Fitrianto, MSi, Adkhilni Utami, MSi, Dr Anisa Rahma, MSi, Dr Drh Desrayni Hanadhita, MSi, dan Andi Hiroyuki, MSi selaku rekan penelitian.
 17. Kakek Sangun dan Almarhumah Nenek Lasiyah yang telah merawat penulis.
 18. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Hartono, SPd, Ibu Daryati, SPd selaku kakak. Tri Novi Wijiyanto dan Solihah selaku adik.
 19. Bapak Idin Haryanto, Ibu Lilik Asiah Prihatin, Bapak Sakri Triyono, Ibu Sundari, Bapak Kusdiyanto, Ibu Titi Suherti serta seluruh keluarga, atas segala doa dan kasih sayangnya.
 20. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Restu Dwi Atmoko S.Hut, Candra Viki A ST, Aminudin S.Pd, M.Pd, Puji Hartanto, Arif Ambiyanto, dan Khafid Anwar Kholid Amd.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan karya ilmiah ini, sehingga membutuhkan banyak masukan dalam mengembangkan tulisan ini. Sekian yang bisa penulis sampaikan semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, 2021
Dwi Budiono

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	49
1.3 Tujuan Penelitian	49
1.4 Manfaat Penelitian	50
1.5 Kebaruan Penelitian	50
1.6 Kerangka Pemikiran	50
2. TINJAUAN PUSTAKA	53
2.1. Embrio Partenogenetik	53
2.2 Perkembangan Embrio Partenogenetik Preimplantasi Mencit	53
2.4 Sel Fibroblas	57
2.5 <i>Embryonic Stem Cell</i> (ESC)	58
3. METODE	59
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	59
3.2 Hewan Coba dan Etik Penelitian	59
3.3 Kultur Embrio Partenogenetik	59
3.4 Morfometri Blastosis	61
3.5 Kultur <i>Rat Embryonic Fibroblast</i> (REF)	62
3.6 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) <i>Conditioned Medium</i> REF	63
3.7 Produksi <i>Feeder Cell</i> REF	64
3.8 Kultur Koloni Primer <i>Parthenogenetic Embryonic Stem Cell</i> (pESC) Mencit	65
3.9 Karakteristik Pluripotensi Koloni Primer pESC	65
3.10 Diferensiasi <i>Parthenogenetic Embryonic Stem Cell</i>	67
3.11 Karakterisasi Sel-sel Hasil Diferensiasi	67
3.12 Analisis Data	67
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	68
4.1 Koleksi Oosit	68
4.2 Aktivasi Partenogenesis	70
4.3 Perkembangan Embrio	71
4.4 Kualitas Blastosis	73
4.5 Seleksi <i>Feeder Cell</i> REF	74
4.6 Kultur Koloni Primer pESC Mencit	76
4.7 Karakterisasi Koloni Primer pESC Mencit	78
4.8 Diferensiasi Koloni Primer pESC Mencit	80
5. PEMBAHASAN UMUM	84
6. SIMPULAN DAN SARAN	90
6.1 Simpulan Umum	90
6.2 Saran Umum	90
7. DAFTAR PUSTAKA	91

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

8.	LAMPIRAN	105
	RIWAYAT HIDUP	112

DAFTAR TABEL

4.1	Perkembangan embrio partenogenetik dan fertilisasi <i>in vitro</i>	72
4.2	Morfometri blastosis dan ICM	74
4.3	Konsentrasi bFGF, EGF, dan IGF1	75
4.4	Tingkat perlekatan dan pembentukan koloni primer blastosis <i>in vitro</i>	77
4.5	Hasil karakterisasi koloni primer menggunakan metode imunositokimia	78
4.6	Kuantifikasi jenis-jenis sel hasil diferensiasi koloni primer	82

DAFTAR GAMBAR

1.1	Skema kerangka pemikiran penelitian	51
2.1	Skema antara <i>adherens junction</i> dan <i>tight junction</i> (TJ)	55
2.2	Skema aktivasi <i>hippo signaling pathway</i>	56
3.1	Prosedur koleksi oosit mencit	60
3.2	Pengukuran morfometri blastosis menggunakan perangkat lunak <i>imageJ</i>	61
4.1	Proses koleksi oosit mencit 14 jam pascapenyuntikan HCG	69
4.2	Perbandingan oosit sebelum dan setelah aktivasi pronukleus	70
4.3	Tahapan perkembangan embrio partenogenetik mencit <i>in vitro</i>	72
4.4	Perkembangan kultur koloni primer blastosis <i>in vitro</i>	77
4.5	Hasil pewarnaan imunositokimia	79
4.6	Hasil pewarnaan <i>alkaline phosphatase</i> (ALP)	79
4.7	Bentuk-bentuk diferensiasi pESC dan ESC	81

DAFTAR LAMPIRAN

1	Medium Kultur REF	105
2	Medium Inaktivasi Sel REF	106
3	Medium Kultur modified <i>Rat 1-cell Embryo Culture Medium</i> (mR1ECM)	107
4	Medium Aktivasi Partenogenetik	108
5	Pembuatan Stok <i>Leukemia Inhibitory factor</i> (LIF) dan <i>Mercaptoethanol</i>	109
6	Pembuatan medium kultur <i>Embryonic Stem Cells</i> (ESC)	110
7	<i>Alkaline Phosphatase Staining</i>	111

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



DAFTAR SINGKATAN

2i	: <i>Two Inhibitors</i>
AJ	: <i>Adherent Junction</i>
ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AR	: <i>Attachment Rate</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
CDK	: <i>Cyclin-dependant Kinase</i>
CM	: <i>Conditioned Medium</i>
COC	: <i>Cumulus Oocyte Complex</i>
CSF	: <i>Cytostatic Factor</i>
DDR2	: <i>Discoidin Domain Receptor</i>
DG	: <i>Diacylglycerol</i>
DPBS	: <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESC	: <i>Embryonic Stem Cell</i>
ES-NP	: <i>Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FSP1	: <i>Fibroblast Specific Protein-1</i>
GCNF	: <i>Germ Cell Nuclear Factor</i>
GFAP	: <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor</i>
GPI	: <i>Glycosyl Phosphatidyl Inositol</i>
GSK-3	: <i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
glt2	: <i>Glycosyltransferase-like Protein 2</i>
HCG	: <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
hESC	: <i>Human Embryonic Stem Cell</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
ICM	: <i>Inner Cell Mass</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IGF-2	: <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
Igf2r	: <i>Insulin-like Growth Factor 2 Receptor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IP3	: <i>Inositol 3-Phosphate</i>
iPS	: <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
ITS	: <i>Insulin Transferin Selenium</i>
IU	: <i>International Unit</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
kDA	: <i>Kilo Dalton</i>

@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



KLF4	: <i>Krupple-like Factor</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LIF	: <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEF	: <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
Mest	: <i>Mesoderm Specific Transcript</i>
ml	: Mili liter
mmol	: Mili mol
MPF	: <i>Maturation Promoting Factor</i>
mR1ECM	: <i>Modified Rat 1-Cell Embryo Culture Medium</i>
MZT	: <i>Maternal-to-zygote Transition</i>
NAC1	: <i>Nucleus Accumbens-1</i>
NEAA	: <i>Non Essential Amino Acid</i>
NeuN	: <i>Neuronal Nuclear Antigen</i>
Oct	: <i>Octamer-binding Protein</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBTDK	: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
PCNA	: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PEDF	: <i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
pESC	: <i>Parthenogenetic Embryonic Stem Cell</i>
pg	: Pico gram
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PLC	: <i>Phospholipase C</i>
PMSG	: <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
PR	: <i>Primary Rate</i>
PVS	: <i>Perivitelline Space</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RE	: Retikulum Endoplasma
REF	: <i>Rat Embryonic Fibroblast</i>
Rex1	: <i>Reduced Expression 1</i>
SDF-1	: <i>Stromal Cell Derived Factor 1</i>
Snrpn	: <i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N</i>
Sox	: <i>Sry-related High Mobility Group (HMG) Box Containing</i>
SrCl2	: <i>Strontium Chloride</i>
SSEA1	: <i>Stage Specific Embryo Antigen 1</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STO	: <i>SIM Mouse Embryo-derived Thioguanine and Oubain Resistant</i>
TE	: <i>Tropectoderm</i>
Tfcp2l1	: <i>Transcription factor CP2-like Protein</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TJ	: <i>Tight Junction</i>
TNAP	: <i>Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase</i>
UTF1	: <i>Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor</i>
ZFX	: <i>X-linked zinc finger protein</i>
ZGA	: <i>Zygotic Genome Activation</i>

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPBUniversity

ZO : *Zonula Occludens*
μg : Mikro gram
μM : Mikro molar
μm : Mikro meter

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.