



PENINGKATAN KOMPETENSI OOSIT DOMBA SECARA *IN VITRO* MELALUI PENAMBAHAN GLUTATION

MITHA YUSMALA



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN BIOLOGI REPRODUKSI
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



(a) 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.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Peningkatan Kompetensi Oosit Domba Secara *In Vitro* Melalui Penambahan Glutation” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun 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 tesis ini.

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

Bogor, Juli 2025

Mitha Yusmala
B3501222027



RINGKASAN

MITHA YUSMALA. Peningkatan Kompetensi Oosit Domba Secara *In Vitro* Melalui Penambahan Glutation. Dibimbing oleh MOHAMAD AGUS SETIADI dan IMAN SUPRIATNA.

Oosit yang kompeten merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan produksi embrio *in vitro*. Produksi embrio *in vitro* (IVEP) merupakan bioteknologi reproduksi berbantuan yang terdiri dari tiga tahap yaitu maturasi *in vitro* (IVM), fertilisasi *in vitro* (IVF), dan kultur *in vitro* (IVC). Salah satu kelebihan dari teknologi ini yaitu memanfaatkan limbah ovarium dari rumah potong hewan yang tidak dimanfaatkan lagi untuk menghasilkan individu baru. Namun, keberhasilan IVEP masih tergolong rendah dibandingkan bioteknologi generasi sebelumnya. Hal ini dapat dipengaruhi oleh sumber gamet (sel telur dan sperma) maupun lingkungan produksi, seperti komposisi media, inkubator CO₂, maupun metabolit hasil ikutan proses metabolisme. Sebagai salah satu komponen pembentuk makhluk hidup, oosit memegang peranan yang sangat penting untuk menghasilkan embrio berkualitas baik. Kualitas oosit sejak dilepaskan dari folikel hingga proses maturasi sangat rentan terhadap stress oksidatif. Stress oksidatif disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan sistem pertahanan antioksidan sehingga dapat menyebabkan kondisi patologis bagi sel. Stress oksidatif yang terjadi selama rangkaian IVEP dapat menyebabkan oosit kehilangan kompetensinya sehingga gagal menjadi matang, gagal terfertilisasi hingga gagal berkembang menjadi embrio. Efek buruk radikal bebas dapat ditanggulangi dengan pemberian antioksidan baik yang bersifat enzimatis maupun non-enzimatis. Glutation merupakan tiol non-protein paling melimpah yang berperan sebagai antioksidan utama dalam melindungi sel dari stress oksidatif. Pada produksi embrio *in vitro*, GSH sebagai antioksidan mampu mencegah stress oksidatif yang disebabkan oleh peningkatan ROS baik pada proses pematangan oosit, fertilisasi hingga perkembangan awal embrio. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efektifitas penambahan glutathione pada sistem pematangan dan fertilisasi dalam meningkatkan kompetensi oosit domba secara *in vitro*.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama merupakan maturasi oosit *in vitro*. Pada tahap ini, oosit dibagi menjadi empat kelompok dan dimatangkan dalam medium maturasi yang masing-masing ditambahkan GSH 0 mM (kontrol), GSH 0,5 mM, GSH 1,0 mM, dan GSH 1,5 mM. Oosit domba dimatangkan selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C. Tahap kedua yaitu fertilisasi *in vitro*. Tahap ini dibagi menjadi tiga kelompok antara lain penambahan GSH 1,0 mM (dosis optimum yang diperoleh pada penelitian tahap I) pada medium maturasi (IVM+; IVF-), medium fertilisasi (IVM-; IVF+), serta kombinasi medium maturasi dan fertilisasi (IVM+; IVF+). Setelah 24 jam maturasi, oosit kemudian difertilisasi menggunakan semen beku domba yang telah di *thawing* dalam *waterbath* dengan suhu 37°C. Penelitian ini menggunakan konsentrasi sperma 5x10⁶ per mL. Oosit dan sperma kemudian di ko-inkubasi selama 14 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C. Tingkat maturasi dan fertilisasi oosit dievaluasi menggunakan pewarnaan *aceto-orcein* 2%. Hasil penelitian tahap pertama diperoleh bahwa secara umum penambahan GSH pada medium maturasi memberi pengaruh positif



terhadap kemampuan perkembangan oosit domba. Penambahan GSH dengan dosis bertingkat mampu meningkatkan kompetensi oosit yang mencapai MII dari 73,41% hingga 87,00% dengan dosis optimum berada pada penambahan GSH 1,0 mM. Penambahan GSH 1,0 mM pada medium maturasi (87,00%) menghasilkan persentase oosit mencapai MII secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok GSH 0,5 mM (73,41%), GSH 1,5 mM (78,23%), dan kontrol (70,50%). Oleh karena itu, dosis GSH 1,0 mM dipilih untuk dilanjutkan ke penelitian tahap kedua yaitu fertilisasi *in vitro*. Hasil penelitian tahap kedua diperoleh bahwa persentase tingkat fertilisasi normal (2PN) pada kelompok yang ditambahkan GSH dalam medium IVM (56,43%) secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan kelompok yang ditambahkan GSH pada medium kobinasi maturasi dan fertilisasi (18,45%). Demikian pula, persentase tingkat fertilisasi total pada kelompok penambahan GSH dalam medium IVM (58,21%) secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan kelompok penambahan GSH dalam medium maturasi dan fertilisasi (18,45%). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan GSH dalam medium IVM memiliki pengaruh lebih nyata dalam meningkatkan tingkat fertilisasi oosit domba. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa penambahan glutathione 1,0 mM pada media maturasi lebih efektif dalam meningkatkan kompetensi oosit domba untuk menjadi matang dan menghasilkan tingkat fertilisasi lebih baik.

Kata kunci: fertilisasi, glutathione, *in vitro*, maturasi, oosit domba



SUMMARY

MITHA YUSMALA. Improvement of Sheep Oocyte Competence In Vitro Through Glutathione Addition. Supervised by MOHAMAD AGUS SETIADI and IMAN SUPRIATNA.

Oocyte competence is a primary factor for the success of embryo production in vitro. In vitro embryo production (IVEP) is an assisted reproductive biotechnology that consists of three stages, namely, in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF), and in vitro culture (IVC). One of the advantages of this technology is utilizing ovarian waste from slaughterhouses that is no longer used to produce new individuals. However, the success of IVEP is still relatively low compared with previous generations of biotechnology. This can be influenced by the source of gametes (eggs and sperm) and production environment, e.g., media composition, CO₂ incubator, and metabolites produced from the metabolic process. As one of the components that form living things, oocytes play a very important role in producing good-quality embryos. The quality of oocytes from they are released from the follicle to the maturation process is very susceptible to oxidative stress. Oxidative stress is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defense system, which can cause pathological conditions for cells. Oxidative stress during the IVEP series can cause oocytes to lose their competence, so they fail to mature, fail to be fertilized, and fail to develop into early embryos. The adverse effects of free radicals can be overcome by administering enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Glutathione is the most abundant non-protein thiol and is the main antioxidant that protects cells from oxidative stress. In in vitro embryo production, GSH as an antioxidant can prevent oxidative stress caused by increased ROS in oocyte maturation, fertilization, and early embryo development. This study aimed to analyze the effectiveness of adding glutathione to the maturation and fertilization system in increasing the competence of sheep oocytes in vitro.

This study consists of two stages. The first stage is in vitro maturation. At this stage, oocytes are divided into four groups and matured in a maturation medium, each added with 0 mM GSH (control), 0.5 mM GSH, 1.0 mM GSH, and 1.5 mM GSH. Sheep oocytes are matured for 24 hours in a 5% CO₂ incubator at 38.5°C. The second stage is in vitro fertilization. This stage is divided into three groups, including the addition of 1.0 mM GSH (the optimum dose obtained in the first stage of the study) to the maturation medium (IVM+; IVF-), fertilization medium (IVM-; IVF+), and a combination of maturation and fertilization medium (IVM+; IVF+). After 24 hours of maturation, the oocytes were then fertilized using frozen sheep semen that had been thawed in a water bath at 37°C. This study used a sperm concentration of 5×10^6 per mL. The oocytes and sperm were co-incubated for 14 hours in a 5% CO₂ incubator at 38.5°C. The oocyte maturation and fertilization rate were evaluated using 2% aceto-orcein staining. The results of the first stage of the study showed that, in general, the addition of GSH to the maturation medium had a positive effect on the development ability of sheep oocytes. The addition of GSH with graded doses increased the competence of oocytes that reached MII from 73.41% to 87.00%, with the optimum dose being the addition of 1.0 mM GSH. The



addition of 1,0 mM GSH in the maturation medium (87.00%) resulted in a significantly higher ($P < 0.05$) percentage of oocytes reaching MII compared to the 0.5 mM GSH (73.41%), 1.5 mM GSH (78.23%), and control (70.50%) groups. Therefore, the 1,0 mM GSH dose was chosen to continue to the second stage of the study, namely in vitro fertilization. The results of the second stage of the study showed that the percentage of normal fertilization rate (2PN) in the group added with GSH in IVM medium (56.43%) was significantly higher ($P < 0.05$) than the group added with GSH in the combination of maturation and fertilization medium (18.45%). Similarly, the percentage of total fertilization rate in the GSH supplementation group in the IVM medium (58,21%) was significantly higher ($P < 0.05$) than in the GSH supplementation group in the maturation and fertilization medium (18.45%). This indicates that the addition of GSH in the maturation medium has a more significant effect in increasing the fertilization rates of oocytes. Therefore, it can be concluded that adding 1.0 mM glutathione in the maturation medium is more effective in increasing the competence of sheep oocytes to mature and results in improved fertilization rates.

Keywords: fertilization, glutathione, in vitro, maturation, sheep oocyte



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 2025
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 IPB.

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



PENINGKATAN KOMPETENSI OOSIT DOMBA SECARA IN VITRO MELALUI PENAMBAHAN GLUTATION

MITHA YUSMALA

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Ilmu Biomedis Hewan

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN BIOLOGI REPRODUKSI
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



(a) Hak cipta milik IPB University

IPB University



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

Tim Penguji pada Ujian Tesis:

1. Prof. drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P., Ph.D



Judul Tesis : Peningkatan Kompetensi Oosit Domba Secara *In Vitro* Melalui Penambahan Glutathione

Nama : Mitha Yusmala

NIM : B3501222027

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi



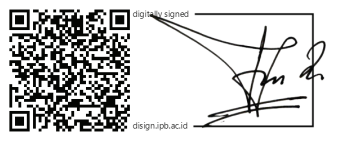
Pembimbing 2:
Prof. Dr. drh. Iman Supriatna

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. drh. Bambang Pontjo Priosoeryanto, MS,
Ph.D, APVet, DACCM.
NIP. 196002281986011001



Dekan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis
Prof. drh. Amrozi, Ph.D.
NIP. 197007211995121001



Tanggal Ujian: 03 Juli 2025

Tanggal Lulus:



(a) 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.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Peningkatan Kompetensi Oosit Domba Secara *In Vitro* Melalui Penambahan Glutation”**. Penulisan tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University. Penulis dalam kesempatan ini ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis dalam melaksanakan pendidikan, penelitian, menyusun dan menyelesaikan penulisan tesis ini, yaitu kepada:

1. Prof. Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi selaku Ketua Komisi Pembimbing dan Prof. Dr. drh. Iman Supriatna selaku Anggota Komisi Pembimbing atas bimbingan, nasihat, motivasi serta kritik yang sifatnya membangun dalam penyelesaian penelitian dan penulisan tesis ini;
2. Prof. drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P., Ph.D selaku Penguji Tesis dari luar komisi pembimbing atas saran, masukan, serta kritiknya guna memperkaya dan menyempurnakan substansi dari tesis ini;
3. Ketua Program Studi Ilmu Biomedis Hewan beserta seluruh jajarannya atas bantuannya selama penulis melaksanakan studi;
4. Seluruh dosen dan tenaga kependidikan Program Studi Ilmu Biomedis Hewan khususnya bagian Divisi Reproduksi dan Kebidanan, atas ilmu, pengalaman, dan seluruh bantuannya selama penulis menempuh studi;
5. Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi atas Beasiswa Penelitian melalui Basis Informasi Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (BIMA) dengan skema Penelitian Tesis Magister Tahun 2024;
6. Laboratorium fertilisasi *in vitro* (IVF), Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University;
7. Ayahanda La Sidundu, S.Pd. tercinta dan Ibunda Riati Ntere tercinta, Nilam Nuralika Putri, S.Pd., M.Pd., Harzat, S.T., Litha Mutriwana, Zahwa Nur Shaliha dan seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan dan memberi dukungan kepada penulis;
8. Amirudin, S. Kep. yang selalu mendoakan, menyemangati, memberi dukungan, dan motivasi kepada penulis;
9. Sahabat seperjuangan penelitian IVF (drh. Arindya Andrian, M.Si., drh. Asman Ramadhan Damanik, M.Si., dan Metalia Gunsari, S.Pt.), teman-teman dan senior BRP (Immanuella Tumatenden, S.Pt., drh. Rita Oktaria, Ahad Putra Dewantara, S.Si., Johana Dian Rahayu, S.Si., M.Si., dr. Evi Istiqamah, M. Biomed, drh. Rizal Gusdinar, M.Si., Khalista Khalis, S.Si., M.Si., dan drh. Rimas Prathita Agustin, M.Si.) atas kebersamaannya;
10. Saffat Aqiqah dan Qurban, beserta jajarannya atas bantuan dan kerjasamanya selama kegiatan pengambilan sampel penelitian.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat memperkaya khazanah keilmuan dalam bidang Bioteknologi Reproduksi.

Bogor, Juli 2025

Mitha Yusmala



(a) Hak cipta milik IPB University

IPB University



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

Perpustakaan IPB University



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
1.5 Hipotesis	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Maturasi <i>In Vitro</i>	3
2.2 Fertilisasi <i>In Vitro</i>	4
2.3 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	5
2.4 Glutation	6
III METODE PENELITIAN	7
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	7
3.2 Alat dan Bahan	7
3.3 Prosedur Penelitian	7
3.4 Analisis Data	9
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	10
4.1 Kompetensi Pematangan Inti Oosit setelah Penambahan Glutation	10
4.2 Kompetensi Pembentukan Pronukleus setelah Penambahan Glutation	12
V SIMPULAN DAN SARAN	14
5.1 Kesimpulan	14
5.2 Saran	14
DAFTAR PUSTAKA	15
LAMPIRAN	21
RIWAYAT HIDUP	25



DAFTAR TABEL

1	Tingkat pematangan inti oosit domba setelah penambahan GSH pada medium maturasi	10
2	Tingkat fertilisasi oosit domba setelah penambahan GSH	12

DAFTAR GAMBAR

1	Tahap pematangan inti dan pematangan sitoplasma oosit sampai pembentukan zigot	3
2	Faktor-faktor yang menyebabkan stress oksidatif selama maturasi <i>in vitro</i>	6
3	Tahapan pematangan inti oosit domba setelah maturasi <i>in vitro</i>	11
4	Pembentukan pronukleus (PN) setelah fertilisasi <i>in vitro</i>	13

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi Medium Transportasi Ovarium	21
2	Komposisi Medium <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	21
3	Komposisi Medium Koleksi Oosit	21
4	Komposisi Medium Maturasi <i>In Vitro</i>	22
5	Komposisi Medium Fertilisasi <i>In Vitro</i>	22
6	Pembuatan Stok Glutation	23