



Efek Ekstrak Biji Kapas (*Gossypium hirsutum*) terhadap Kualitas dan Perkembangan Embrio Mencit (*Mus musculus*)

Nofri Zayani^{1*}, Ramadani Yulita²

¹Jurusan Keperawatan, Universitas Yatsi Madani, Banten, Indonesia

²Jurusan Keperawatan, STIKes Piala Sakti, Pariaman, Indonesia

*Koresponden Penulis : nofrizayani11@gmail.com

ABSTRAK

Biji kapas mengandung senyawa metabolit sekunder gosipol yang mampu menurunkan fertilitas dengan mengganggu proses pembentukan dan perkembangan folikel serta oosit. Gangguan folikulogenesis dapat menurunkan kualitas dan kompetensi oosit untuk difertilisasi sehingga berdampak pada kualitas dan perkembangan embrio. Tujuan penelitian ini mengkaji efek ekstrak biji kapas (EBK) terhadap kualitas dan perkembangan embrio mencit. Desain penelitian eksperimen total dengan rancangan acak lengkap terdiri atas 4 perlakuan (0; 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg BB) dan 6 ulangan. EBK diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol 80%. Pemberian EBK dilakukan melalui oral selama 24 hari. Mencit dikawinkan pada hari terakhir pemberian EBK. Embrio dikoleksi pada hari ke-4 kebuntingan dengan melakukan flushing kornua uterus, kemudian ditentukan stadium perkembangan dan kualitas embrionya. Embrio dikultur secara in vitro selama 48 jam dalam medium kultur PBS yang disuplementasikan 10% FBS. Hasil penelitian menunjukkan EBK dosis 2.7 g/kg BB menurunkan kualitas embrio dengan ditemukannya embrio retarded dan degenerasi, serta oosit unfertilisasi. Penurunan jumlah dan kualitas embrio yang berhasil berkembang ke tahapan blastosis, expanded blastosis, dan hatched blastosis terjadi setelah dikultur selama 48 jam. Embrio retarded (4-8 sel) dan degenerasi tidak berkembang pada kultur 24 jam. Kesimpulannya EBK menurunkan kualitas dan menghambat perkembangan embrio mencit sehingga dapat dijadikan sebagai kandidat bahan kontrasepsi herbal.

Kata kunci: *Biji Kapas, Gosipol, Kualitas Embrio, Perkembangan Embrio*

ABSTRACT

The cottonseed contained gossypol which can reduce fertility by disrupting follicles and oocytes formation process and development. Folliculogenesis disorder can reduce quality and competence of oocytes to be fertilized. It has an impact on the quality and development of the embryo. The objective of this study was to evaluate the cottonseed extract effect on the quality and development of mice embryos. The research used a total experiment with completely randomized design consist of 4 treatments (0; 1.5; 2.1; and 2.7 g/kg BW EBK) and 6 replications. EBK are extracted maceration using ethanol 80%. EBK administration was orally injection for 24 days. Last day of EBK administration, mices were mated. Embryos were collected on the 4 days of pregnancy by flushing the uterine cornua, then development stage and quality of embryos were determined. Embryos were then cultured in vitro for 48 hours in culture medium PBS supplemented by 10% FBS. The result showed that EBK 2.7 g/kg BW dose can reduce embryos quality by finding retarded, degenerated, and unfertilized oocytes. The decreased embryos number and ability to progress to the blastocysts, expanded blastocysts, and hatched blastocysts stage occurred after culture for 48 hours. Retarded (4-8 cells) and degenerated embryos are not development in 24 hours culture. In conclusion, EBK is able reduce quality and development inhibit of mice embryos, so that it can be used as candidates for herbal contraception.

Keywords: *Cottonseed, Embryo Development, Embryo Quality, Gosipol*

doi: 10.33474/e-jbst.v9i2.554

Diterima tanggal 22 Januari 2024 – Diterbitkan Tanggal 29 Januari 2024

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>



Pendahuluan

Indonesia sebagai Negara berkembang saat ini telah memiliki penduduk berjumlah 270, 20 juta jiwa. Jumlah ini mengalami peningkatan sekitar 32.65 juta jiwa dalam jangka 10 tahun [1]. Pertambahan jumlah penduduk ini berdampak pada kualitas sumber daya manusia, kesejahteraan, dan kesehatan. Pemerintah terus melakukan upaya untuk mengontrol jumlah penduduk, salah satunya dengan mengeluarkan anjuran agar pasangan usia subur (PUS) menggunakan kontrasepsi untuk mengatur jumlah dan jarak anak yang dilahirkan.

Kontrasepsi merupakan upaya mencegah pertemuan sel telur atau oosit yang matang dengan spermatozoa agar tidak terjadi kehamilan [2]. Jenis kontrasepsi yang tersebar ditengah masyarakat dapat digolongkan menjadi metode sederhana (seperti pantang berkala, kalender, suhu badan basal, lendir serviks, *coitus interruptus*, kondom, serta spermisida) dan modern (hormonal seperti pil, suntik, susuk, alat kontrasepsi dalam rahim atau AKDR, medis operatif wanita atau MOW, serta medis operatif pria atau MOP) [3]. Sampai saat ini, pemerintah masih mengalami kendala dalam menghimbau masyarakat untuk menggunakan kontrasepsi. Permasalahan yang sering muncul adalah resiko efek samping penggunaan kontrasepsi.

Pemakaian kontrasepsi sederhana sering menimbulkan ketidaknyamanan pada saat berhubungan seksual. Sedangkan pemakaian kontrasepsi modern menimbulkan efek samping seperti kenaikan berat badan (41%), keputihan (37%), amenorea (30%), flek (29%), perdarahan haid yang berlebihan (19%), jerawat (17%), depresi (12%), penurunan libido (10.5%), kenaikan tekanan darah (10%), dan lainnya [4]. Semua resiko efek samping ini sering membuat akseptor menolak untuk menggunakan kontrasepsi.

Kontrasepsi yang ideal seharusnya memenuhi persyaratan efektif, aman, frekuensi pemakaian yang tidak terlalu sering, efek samping rendah, adanya kemauan dan kemampuan akseptor, mudah, dan murah [5]. Banyak masyarakat beralih menggunakan kontrasepsi dari bahan herbal karena dianggap memenuhi persyaratan tersebut. Salah satu bahan herbal yang dapat dimanfaatkan untuk kontrasepsi adalah biji kapas (*Gossypium hirsutum*). Biji kapas sering diolah menjadi tepung untuk campuran bahan makanan karena dapat menambah mineral, nilai gizi, dan rasa pangan. Biji kapas mengandung protein (30.45%), lemak (44.33%), karbohidrat (3.66%), dan Nitrogen (4.7%). Selain itu, biji kapas mengandung metabolit sekunder yang disebut dengan gosipol [6].

Gosipol merupakan senyawa polifenol berwarna kuning yang bersifat antifertilitas, sitotoksik dan antisteroidogenesis [7]. Gosipol yang terkandung dalam biji kapas telah terbukti dapat menurunkan fertilitas dengan mengganggu folikulogenesis atau pembentukan dan perkembangan folikel serta oosit [8]. Gangguan folikulogenesis ini terjadi karena gosipol mengakibatkan stress oksidatif pada folikel yang sedang berkembang dan oosit sebagai sel yang aktif membelah dengan mudah menyerapnya masuk ke dalam sel sehingga menimbulkan degenerasi pada oosit. Sementara itu, kemampuan atau kompetensi oosit untuk dapat difertilisasi oleh sel spermatozoa diperoleh selama proses folikulogenesis dan pematangannya [9]. Oleh karena itu, gangguan folikulogenesis mengakibatkan kerusakan dan penurunan jumlah folikel yang diovulasikan sehingga berimbas pada kuantitas, kualitas, dan kompetensi oosit [10].

Oosit yang berkualitas dan kompeten menentukan keberhasilan untuk berkembang menjadi embrio. Kualitas oosit mempengaruhi kelangsungan hidup awal embrio, implantasi, dan perkembangan janin [11]. Diduga kerusakan oosit yang diakibatkan oleh pemberian gosipol biji kapas dapat berimplikasi pada kualitas dan perkembangan embrio. Pada sapi, pemberian gosipol menyebabkan rendahnya embrio yang berkembang dari morula ke blastula dan tingginya persentase embrio degenerasi. Hal ini terjadi karena gosipol dapat mengganggu proses respirasi sel di mitokondria sehingga persediaan energi (ATP) untuk perkembangan pun minim [8,17]. Untuk itu, penelitian pemberian gosipol yang didapat dari proses ekstraksi biji kapas telah dilakukan untuk mengamati pengaruhnya terhadap kualitas dan perkembangan embrio sebagai dampak kerusakan yang terjadi pada oosit hewan



uji mencit. Tujuan penelitian ini mengkaji efek pemberian ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum*) terhadap kualitas dan perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*).

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum *gavage* (sonde lambung), perangkat bedah, petri dish 35 mm (*SPL* dan *Nunclon*), mikroskop fase kontras, inkubator CO₂, *laminar air flow*, pipet Pasteur, lumpang dan alu, gelas ukur, Erlenmeyer, dan kamera dokumentasi. Bahan yang digunakan yaitu biji kapas, etanol 80%, *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0.2%, serta medium koleksi *modified phosphate buffered saline* (mPBS) yang disuplementasikan 5% *fetal bovine serum* (FBS) dan untuk kultur embrio mPBS yang disuplementasikan 10% FBS.

Metode

Desain penelitian merupakan eksperimen dengan rancangan acak lengkap yang terdiri atas 4 perlakuan berupa dosis ekstrak biji kapas (EBK) bertingkat dan 6 ulangan berupa indukan mencit. Perlakuan yang diberikan yaitu berupa pemberian EBK dengan dosis 0 (diberi pelarut EBK yaitu Na-CMC 0.2%) untuk kelompok kontrol (P1); 1.5 g/kg BB untuk kelompok 2 (P2); 2.1 g/kg BB untuk kelompok 3 (P3); dan 2.7 g/kg BB untuk kelompok 4 (P4).

Cara Kerja

1. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina strain *DDY* dengan kondisi fisik sehat, usia berkisar 14-15 minggu, dan bobot 30-35 g sebanyak 24 ekor. Sedangkan mencit jantannya berumur 11-12 minggu dengan berat badan berkisar 30-35 g sebanyak 8 ekor. Penentuan jumlah sampel mencit mengikuti rumus *Federer* yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, dengan $t = \text{treatment}$ atau perlakuan dan $r = \text{replay}$ atau pengulangan. Mencit didatangkan dari Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan Institut Pertanian Bogor (IPB) yang diadaptasi selama 2 minggu. Pemberian obat cacing Combantrin® 1.4 mg/kg BB dosis tunggal dilakukan satu hari pada minggu kedua adaptasi. Pengandangan dilakukan dengan aturan lima ekor betina/kandang sementara jantan satu ekor/kandang, tertutup kawat dan dialasi dengan sekam kayu yang diganti dua kali seminggu. Ruangan tempat kandang diberikan ventilasi yang cukup dengan suhu lingkungan berkisar 23-27°C. Siklus terang ruangan diatur pukul 06.00-8.00 WIB dan gelap pukul 18.00-06.00 WIB. Pakan diberikan 5 g untuk satu ekor setiap harinya dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

2. Pembuatan ekstrak biji kapas

Bahan uji EBK didapat melalui proses ekstraksi menggunakan metode maserasi etanol 80%. Biji kapas berasal dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (Balittas) Malang, Provinsi Jawa Timur. Biji kapas yang digunakan berbentuk bulat lonjong utuh, berwarna coklat kehitaman dan terpisah dari seratnya. Biji kapas dicuci dengan air yang mengalir kemudian dikeringkan dan digerus menggunakan lumpang serta alu, kemudian disaring dengan tapisan untuk diambil serbuk simplisianya. Selanjutnya dilakukan perendaman 500 g dalam dua L pelarut etanol selama tiga hari.

doi: 10.33474/e-jbst.vxix.xxx

Diterima tanggal X Y XXXX – Diterbitkan Tanggal X Y XXXX

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Filtrat yang diperoleh dari perendaman dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 68 °C hingga diperoleh serbuk ekstrak. Penghitungan rendemen ekstrak dilakukan dengan

menimbang serbuk ekstrak, kemudian disimpan dalam kulkas pada suhu 4 °C [12]. Pemberian ekstrak biji kapas pada mencit berupa suspensi yang dibuat dengan melarutkan serbuk ekstrak dengan *sodium-carboxy methyl cellulose* (Na-CMC) 0.2%.

3. Injeksi ekstrak biji kapas pada hewan uji dan koleksi embrio

Pemberian EBK dilakukan secara oral sesuai dosis perlakuan selama 24 hari. Mencit dikawinkan secara alami pada hari ke-24 pemberian EBK. Teknik pengawinan dengan menempatkan empat ekor betina ke dalam suatu kandang yang berisi satu ekor mencit jantan. Penempatan mencit betina dan jantan dilakukan pada pukul 16.30 WIB selama \pm satu minggu. *Coitus* atau hari pertama (D1) kebuntingan diobservasi melalui keberadaan sumbat vagina pada besok paginya. Mencit yang *coitus* dipelihara terpisah dari mencit yang belum koitus. Pengambilan data embrio dilakukan pada hari ke empat (D4) kebuntingan mencit dengan euthanasia dislokasi *servikalis* [14]. Koleksi embrio dilakukan dengan metode pembilasan (*flushing*) *cornua uteris* dengan 1 ml medium koleksi mPBS+5% FBS. Setiap *cornua uteris* dibilas dari arah *bifurcatio* ke *apex cornua uteri*. Hasil bilasan ditampung dalam petri *dish* yang berisi satu ml medium koleksi dan diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan terhadap stadium perkembangan dan morfologi embrio mencit pada D4 kebuntingan untuk menentukan kualitasnya. Stadium perkembangan embrio diamati dengan menghitung jumlah sel blastomer dan tampilan morfologi diobservasi dari segi bentuk, ukuran, dan kekompakan blastomer, sel debris, serta zona pelusida yang dimodifikasi dari Supriatna (2013) [14]. Embrio pada D4 kebuntingan mencit seharusnya berada pada stadium morula sampai blastosis.

4. Kultur embrio

Embrio mencit yang berhasil dikoleksi kemudian dikultur selama 48 jam. Kultur embrio dilakukan dalam dua ml medium mPBS+10% FBS di dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan kondisi udara 5% CO₂. Pengamatan perkembangan embrio secara *in vitro* dilakukan setiap 24 jam hingga jam ke-48. Perkembangan embrio diamati dengan menghitung persentase embrio yang berkembang dari morula dan morula kompak ke tahap blastosis awal, blastosis, *expanded* blastosis, dan *hatching* blastosis; serta perkembangan embrio blastosis awal dan blastosis ke tahap *expanded* blastosis, *hatching* blastosis, dan *hatched* blastosis; serta degenerasi (mati)..

Analisis Data

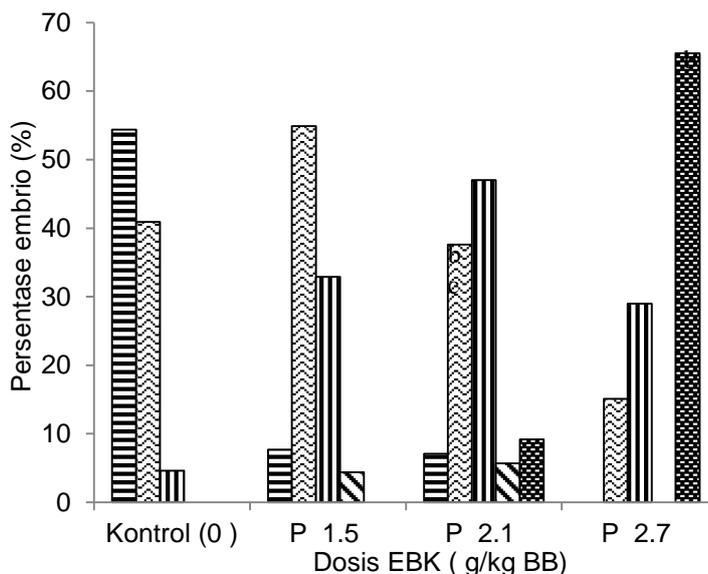
Data dilakukan analisis normalitas untuk mengetahui kenormalan distribusi data menggunakan uji Saphiro Wilk pada $\alpha = 1\%$. Data yang terdistribusikan normal ($p > 0.01$) dilakukan analisis parametrik dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada $\alpha = 1\%$. Perbedaan hasil uji ANOVA dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada $\alpha = 1\%$. Data diolah menggunakan program SPSS Versi 27.

Hasil dan Diskusi

Hasil Penelitian

1. Kualitas embrio

Persentase kualitas embrio yang dihasilkan pada hari ke-4 kebuntingan mencit setelah pemberian EBK selama 24 hari disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Persentase kualitas embrio mencit (*Mus musculus*) setelah pemberian EBK (*Gossypium hirsutum*)
 ■ kualitas 1, ▨ kualitas 2, ▩ kualitas 3, ▤ kualitas 4, ■ kualitas 5.

Perolehan kualitas embrio kategori 1 (sangat baik) menurun seiring dengan peningkatan dosis yaitu 54.4% (kontrol), 7.7% (dosis 1.5 g/kg BB), 7.1% (dosis 2.1 g/kg BB), dan tidak ada (0.0%) pada dosis 2.7 g/kg BB. Penurunan juga terjadi pada embrio yang berkualitas 2 (baik) yaitu 40.9% (kontrol), 54.9% (dosis 1/5 g/kg BB), 37.6% (dosis 2.1 g/kg BB), dan 15.1% (dosis 2.7 g/kg BB). Sementara itu, embrio berkualitas kategori 3 (cukup) terlihat fluktuatif yaitu meningkat pada kelompok dosis 1.5 g/kg BB (32.9%) dan 2.1 g/kg BB (47.0%), namun menurun pada dosis perlakuan 2.7 g/kg BB (29.0%).

Pemberian EBK tidak memengaruhi perolehan persentase embrio berkualitas 4 (jelek). Pemberian ekstrak biji kapas dosis 2.7 g/kg BB mengakibatkan embrio banyak tergolong berkualitas 5 (sangat jelek = 65.5%) yaitu ditemukan embrio *retarded* perkembangan berupa 4 sampai 8 sel, degenerasi, dan oosit tidak terfertilisasi. Pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB tidak ditemukan embrio yang berkualitas 1 (sangat baik). Pemberian ekstrak biji kapas dosis 1.5 dan 2.1 g/kg BB belum efektif dalam menurunkan kualitas embrio karena masih banyak ditemukan embrio berkualitas 1, 2, dan 3. Embrio kualitas 1, 2, dan 3 merupakan embrio yang masih layak transfer dan mampu berkembang ke tahapan selanjutnya.

Uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* umumnya menunjukkan bahwa pemberian EBK secara signifikan menurunkan kualitas embrio ($P < 0.01$) yang diperoleh pada hari ke-4 kebuntingan seperti terlihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil uji DMRT ($\alpha = 1\%$) efek pemberian EBK terhadap kualitas embrio mencit

| Dosis Perlakuan (g/kg BB) | Kualitas I | Kualitas II | Kualitas III | Kualitas IV | Kualitas V |
|---------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------------|
| 0 | 5.83 ^a | 4.50 ^a | 3.17 ^a | 0.0 | 0.00 ^a |
| 1.5 | 0.67 ^b | 4.17 ^{ab} | 2.67 ^{ab} | 0.0 | 0.00 ^a |
| 2.1 | 0.50 ^b | 2.50 ^{bc} | 1.83 ^b | 0.2 | 0.67 ^a |
| 2.7 | 0.00 ^b | 1.00 ^c | 0.50 ^b | 0.0 | 4.50 ^b |

Keterangan: *Superscript* pada baris yang sama dan diikuti oleh notasi huruf yang sama menandakan pemberian perlakuan tidak berbeda nyata terhadap masing-masing kualitas embrio pada uji DMRT $p < 0.01$



Berdasarkan uji lanjut DMRT pada $\alpha = 1\%$ menunjukkan bahwa pemberian EBK sangat berbeda nyata pada embrio yang berkategori 1 (sangat baik) dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.01$). Sementara itu, pemberian EBK tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kualitas embrio kategori 4 (jelek). Dosis perlakuan 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg BB berpengaruh sama terhadap embrio berkualitas 1 (sangat baik) dan III (cukup). Dosis 2.7 g/kg BB berpengaruh berbeda nyata terhadap kualitas embrio kategori V (sangat jelek) yang dihasilkan dari indukan mencit pada hari ke-4 kebuntingannya.

2. Perkembangan embrio

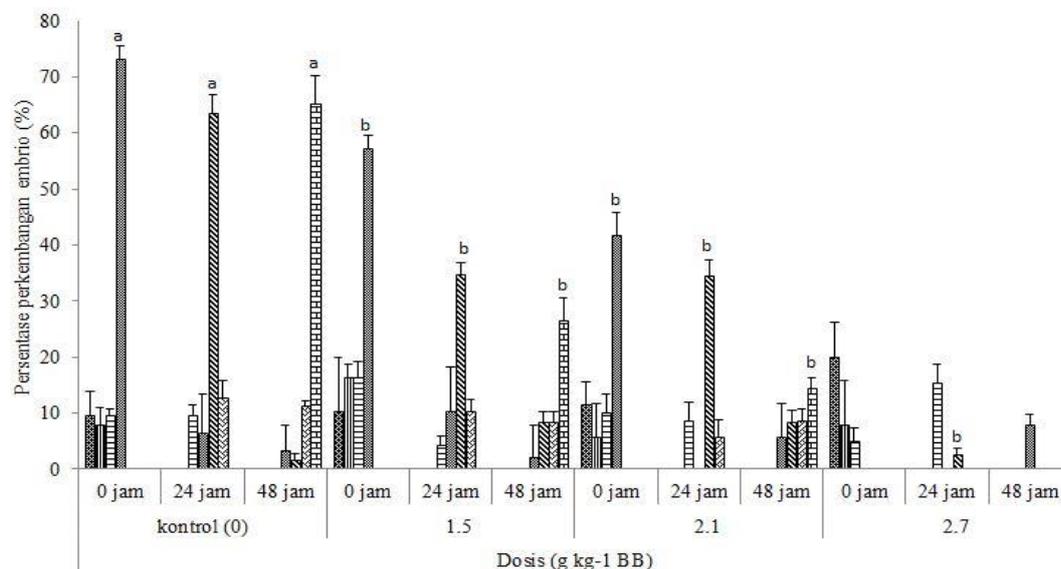
Perkembangan embrio lebih lanjut diamati dengan mengkulturkannya selama 48 jam untuk membuktikan daya hidup embrio dari indukan yang telah dipaparkan EBK peroral selama 24 hari. Pengkulturan dilakukan pada embrio yang berhasil dikoleksi dari indukan mencit bunting 4 hari yaitu berada pada stadium morula, morula kompak, blastosis awal dan blastosis. Persentase embrio ini yang berhasil berkembang setelah 48 jam kultur secara *in vitro* terlihat pada Tabel 2. Pemberian EBK pada indukan mencit berpengaruh secara signifikan menurunkan jumlah embrio yang berkembang ke tahapan selanjutnya setelah dikultur *in vitro* selama 48 jam ($P < 0.01$) dibandingkan dengan kontrol. Penurunan jumlah embrio yang berkembang sangat nyata terjadi pada pemberian EBK dengan dosis 2.7 g/kg BB dari 40 embrio pada 0 jam kultur berkurang menjadi 3 embrio setelah 48 jam dikultur secara *in vitro*. Kultur dari 0 jam menuju 24 jam pada berbagai embrio dari indukan yang terpapar dosis EBK bertingkat berpengaruh secara nyata terhadap penurunan jumlah dan kemampuan berkembang embrio, namun tidak berpengaruh nyata pada kultur 24 menuju 48 jam ($P < 0.01$). Persentase embrio yang berkembang setelah 48 jam paling rendah pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB karena embrio banyak mengalami degenerasi dan *retarded* perkembangan.

Tabel 2. Persentase embrio yang berhasil berkembang setelah kultur *in vitro* setelah 48 jam

| Dosis Perlakuan (g/kg BB) | 0 jam n (% \pm std) | 24 jam n (% \pm std) | 48 jam n (% \pm std) |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0 | 63 (100 \pm 0.0) | 57 (90.48 \pm 2.9) | 50 (79.37 \pm 3.1) |
| 1.5 | 49 (100 \pm 0.0) ^a | 31 (63.27 \pm 4.6) ^b | 21 (42.86 \pm 7.4) ^b |
| 2.1 | 41 (100 \pm 0.0) ^a | 19 (46.34 \pm 6.8) ^b | 8 (19.51 \pm 11.3) ^b |
| 2.7 | 40 (100 \pm 0.0) ^a | 4 (10.00 \pm 13.4) ^b | 3 (7.50 \pm 15.6) ^b |

Keterangan : *Superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata ($P < 0.01$), n = jumlah, % = persentase embrio, dan std = standar deviasi.

Penurunan kemampuan perkembangan embrio dari indukan mencit yang diberi injeksi oral EBK juga terjadi setelah dikultur secara *in vitro* selama 48 jam ($P < 0.01$) seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 5 Persentase embrio dari morula, morula kompak, blastosis awal, dan blastosis menciit yang berkembang setelah kultur secara *in vitro* selama 48 jam.

■ morula, ■ morula kompak, ■ blastosis awal, ■ blastosis, ■ expanded blastosis, ■ hatching blastosis, ■ hatched blastosis. a dan b pada setiap histogram di antara perlakuan di atas menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.01$).

Persentase embrio yang berhasil berkembang ke tahap *expanded* blastosis setelah dikultur selama 24 jam dan tahapan *hatched* blastosis ketika dilanjutkan mengkultur sampai 48 jam menurun dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.01$). Persentase embrio yang berhasil berkembang ke tahapan *expanded* blastosis pada kelompok kontrol (64.3%), dosis 1.5 g/kg BB (35.6%), dosis 2.1 g/kg BB (34.0%), dan 2.7 g kg BB (3.0%) setelah dikultur selama 24 jam. Sementara itu, kultur lanjutan sampai 48 jam menunjukkan persentase embrio yang berhasil mencapai tahapan *hatched* blastosis pada kelompok kontrol (65.0%) lebih tinggi dibandingkan dosis 1.5 g/kg BB (27.0%), dosis 2.1 g/kg BB (14.3%), dan dosis 2.7 g/kg BB (0.0%). Pemberian EBK dengan dosis 1.5 g/kg BB dan 2.1 g/kg BB memberikan efek yang sama terhadap penurunan perkembangan embrio mencapai *expanded* blastosis (35.0% dan 34.0%) pada kultur 24 jam dan *hatching* blastosis (18.0% dan 15.0%) serta *hatched* blastosis (27.0% dan 14.0%) selama kultur 48 jam. Pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB terjadi kegagalan perkembangan embrio yang tinggi dan hanya berkembang sampai tahapan blastosis (7.5%) ($P < 0.01$) setelah kultur 48 jam.

Pembahasan

Kualitas embrio merupakan aspek penting yang menentukan keberhasilan perkembangannya sehingga dapat terimplantasi pada uterus dan menjadi fetus yang siap untuk dilahirkan. Kualitas embrio dinilai dari kesesuaian stadium perkembangannya dengan waktu yang diantisipasi dan tampilan morfologinya [14,15]. Pemberian EBK pada indukan menciit terbukti menghambat stadium perkembangan embrio secara *in vivo* yang dikoleksi pada hari ke-4 kebuntingan. Pada menciit yang diinjeksikan EBK dosis 2.7 g/kg BB tidak ada ditemukan embrio stadium blastosis (0%), sedikit blastosis awal (2.5%), morula kompak (7.5%), morula (23%), 8 sel (25%), 4 sel (18%), dan tingginya oosit unfertilisasi (25%) [15]. Seharusnya pada hari ke-4 kebuntingan menciit, embrio berada pada stadium morula kompak dan blastosis [14]. Pada hamster juga telah dilaporkan bahwa pemberian gosipol dapat menghambat perkembangan embrio untuk mencapai morula sehingga tidak ada embrio



stadium blastosis yang dihasilkan. Sementara itu, pemeriksaan tampilan morfologi embrio menciit dinilai dari sel blastomer (ukuran, ikatan, dan jumlah) serta keintakan zona pelusida. Pengurangan jumlah sel blastomer dapat menyebabkan kematian fetus intrauterus sebelum terimplantasi [16]. Sedangkan kerusakan pada zona pelusida dapat menyebabkan sel blastomer bocor dan embrio menjadi pecah.

Hambatan pada stadium perkembangan dan kerusakan tampilan morfologi embrio menciit secara *in vivo* tentunya langsung mempengaruhi kualitas embrionya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan kualitas embrio seiring dengan hambatan perkembangan secara *in vivo* setelah pemberian EBK. Pemberian EBK dosis 2.7 g/kg BB memperburuk kualitas embrio (kualitas V atau sangat jelek = 65.5%) yaitu mengalami *retarded* perkembangan berupa 4-8 sel, degenerasi, dan oosit unterfertilisasi. Hal serupa juga terjadi pada embrio yang dikoleksi pada sapi setelah pemberian ransum yang mengandung gosipol selama 76 hari yaitu mengakibatkan embrio *retarded* dan degenenerasi sehingga banyak tergolong embrio berkualitas V [15]. Pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB juga tidak ditemukan embrio yang berkualitas I (sangat baik). Pemberian EBK dosis 1.5 g/kg BB dan 2.1 g/kg BB belum efektif dalam menurunkan kualitas embrio karena masih banyak ditemukan embrio berkualitas I, II, dan III. Embrio kualitas I, II, dan III merupakan embrio yang masih layak transfer dan mampu berkembang ke tahapan selanjutnya seperti pada hasil pengamatan embrio pada kultur *in vitro*. Kualitas embrio yang rendah juga berasal dari oosit yang memiliki kualitas and kompetensi yang rendah [10]. Stres oksidatif yang telah terjadi pada oosit selama perkembangannya akibat dipaparkan EBK mengakibatkan kerusakan pada zona pelusida dan penurunan pada kemampuan oosit untuk ditertilisasi dan berkembang [16].

Kualitas embrio menentukan keberhasilan embrio untuk berkembang lebih lanjut dan terimplantasi [19]. Pada penelitian ini, embrio yang berkualitas I, II, dan III atau layak transfer dilakukan pengkulturan secara *in vitro* untuk mengamati kemampuan perkembangannya lebih lanjut. Pengkulturan selama 48 jam dilakukan pada embrio stadium morula, morula kompak, blastosis awal dan blastosis. Pemberian EBK menurunkan kemampuan perkembangan embrio yang dikultur secara *in vitro* selama 48 jam ($P < 0.05$). Hal ini terlihat dari penurunan persentase embrio yang berhasil berkembang ke tahap *expanded* blastosis yang dikultur selama 24 jam dan tahapan *hatched* blastosis yang dilanjutkan kultur sampai 48 jam dibandingkan dengan kontrol. Pemberian gosipol dosis tinggi (265 ng) pada kultur embrio blastosis tikus juga mengakibatkan kegagalan perkembangannya mencapai tahapan *hatched* blastosis (0.0%) [20]. Kegagalan perkembangan embrio parah terjadi pada pemberian EBK 2.7 g/kg BB. Embrio hanya mampu berkembang sampai stadium blastosis setelah kultur 48 jam.

Pada 48 jam kultur *in vitro* atau 144 jam perkembangan *in vivo*, stadium perkembangan yang diantisipasi adalah embrio sudah mulai mengalami implantasi di uterus atau di permukaan petri dish [15]. Oleh karena itu, beberapa embrio pada kelompok kontrol yang telah mencapai stadium perkembangan *hatched* blastosis memperlihatkan tanda implantasi yaitu menempel pada permukaan petri dish setelah dikultur *in vitro* selama 48 jam. Kesesuaian stadium perkembangan embrio dengan waktunya merupakan aspek penting yang menentukan keberhasilan implantasi [14]. Sementara itu, embrio yang hanya sampai tahapan blastosis setelah kultur 48 jam ini tidak akan berhasil implantasi dan berkembang lanjut. Hasil penelitian pada sapi juga memperlihatkan bahwa embrio dari indukan yang sudah diberi pakan campuran gosipol memiliki daya perkembangan yang rendah setelah ditransferkan pada resepien normal [20].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio yang dapat berkembang baik selama kultur 48 jam adalah blastosis dibandingkan morula, morula kompak, dan blastosis awal. Hal ini diduga karena embrio blastosis berasal dari oosit yang masih berkualitas baik dan kompeten untuk berkembang ke tahapan *expanded* dan *hatched* blastosis. Pemberian EBK menyebabkan embrio stadium morula dan kompak morula sedikit yang dapat berkembang setelah kultur 48 jam. Pada saat perkembangan morula menuju kompak morula terjadi pembentukan *tight junction* yang penting untuk ekspansi blastosol yang



mendukung pembentukan blastosis. Gosipol dalam EBK yang diberikan pada indukan mencit diperkirakan dapat mengakibatkan kerusakan pada pembentukan tight junction sehingga ikatan blastomer pada embrio morula menjadi longgar dan terjadi degenerasi [14]. Hal ini terbukti dari hasil penelitian bahwa EBK 2.7 g/kg BB mengakibatkan embrio morula mengalami degenerasi (20.0%).

Penurunan persentase embrio berkembang dari 0 menuju 24 jam terjadi secara signifikan setelah indukan diberi EBK selama 24 hari, namun tidak berbeda nyata pada kultur 24 menuju 48 jam. Hal ini karena pada 0 jam (D4 kebuntingan) embrio mencit tergolong embrio degenerasi dan mengalami retarded perkembangan (4-8 sel). Embrio yang mengalami retarded dan degenerasi memiliki kemampuan perkembangan yang rendah [14]. Oleh karena itu, embrio degenerasi dan retarded perkembangan gagal berkembang pada kultur 24 jam. Kematian embrio dini ini dapat terjadi sebelum tahapan 16 sel diakibatkan oleh kerusakan pada oosit.

Mekanisme kerusakan oosit akibat EBK berasal dari akumulasi gosipol pada organ reproduksi ovarium yaitu berikatan dengan molekul fosfolipid, lipoprotein dan kolesterol membran plasma dan membran organel sel. Akumulasi gosipol pada konsentrasi tinggi ditemukan pada antrum folikel sehingga menghambat produksi hormon estrogen [14]. Kekurangan estrogen menyebabkan folikel atresia pada setiap perkembangannya [19]. Selain itu, gosipol juga mengganggu sintesis hormon steroid ovarium dengan menekan kerja enzim kunci steroidogenik [7] dan efek sitotoksik dengan merusak secara langsung pada perkembangan folikel. Efek sitotoksik gosipol merusak perkembangan folikel dengan terbentuknya oksigen reaktif (O_2^-) yang memicu peroksidasi membran dan stres oksidatif sel sehingga mengganggu komunikasi antar sel, transpor ion Kalsium (Ca^{2+}) dan menginduksi apoptosis [17]. Rangkaian mekanisme ini mengakibatkan peningkatan degenerasi folikel, folikel atresia, dan pengurangan folikel berkembang yang diikuti oleh kerusakan dan pengurangan kompetensi oosit [20]. Oosit yang kurang kompeten mengurangi kemampuan perkembangan embrio ke tahapan lebih lanjut [14, 15]. Oleh karena itu, diperkirakan penurunan persentase embrio mencit terjadi karena pemberian EBK merusak oosit sehingga tidak mampu untuk berkembang lanjut menjadi embrio.

Kesimpulan

Pemberian ekstrak biji kapas menurunkan kualitas dan menghambat perkembangan embrio mencit yang dikultur secara *in vitro*. Dosis ekstrak biji kapas yang paling baik pada dosis 2.7 g/kg BB. Berdasarkan pada efek yang ditimbulkan, ekstrak biji kapas memiliki zat antifertilitas dan dapat diklasifikasikan sebagai bahan kontrasepsi herbal.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rumah Sakit Hewan IPB dan sivitas akademik IPB. Terima kasih juga kami sampaikan kepada LPPM Universitas Yatsi Madani yang telah memberikan dukungan dan memfasilitasi seluruh kegiatan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Badan Pusat Statistik. 2020. Hasil Sensus Penduduk 2020. *Berita Resmi Statistik*, 7(10): 1-12.
- [2] Yunita, E. M. 2019. *Penggunaan Kontrasepsi Dalam Praktik Klinik dan Komunitas*. UB Press: Malang.
- [3] Wirenviona E, Riris C, Susanti NF, Wahidah NJ, Kustantina AZ, Joewono HT. 2021. *Kesehatan Reproduksi dan Tumbuh Kembang Janin Sampai Lansia pada Perempuan*. Airlangga University Press: Surabaya.



- [4] Setiawati E, Handayani OWK, Kuswardinah A. 2017. Pemilihan Kontrasepsi Berdasarkan Efek Samping pada Dua Kelompok Usia Reproduksi. *Unnes Journal of Public Health*, 6(3): 167-173.
- [5] Musdalifah, Sarake M. 2013. Faktor yang Berhubungan dengan Pemilihan Kontrasepsi Hormonal Pasutri di Wilayah Kerja Puskesmas Lampa Kecamatan Duampanua Kabupaten Pinrang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 2(1): 1-13.
- [6] Diana NE. 2016. Pengaruh Waktu Perebusan terhadap Kandungan Proksimat, Mineral dan Kadar Gosipol Tepung Biji Kapas. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 13(1): 100-107.
- [7] Hernandez E. 2016. Cottonseed. *Article Food Sci*, 1:1-5. Doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00025-1.
- [8] Ramadhani S, Supriatna I, Karja NWK, Winarto A. 2017. Pengendalian Folikulogenesis Ovarium dengan Pemberian Ekstrak Biji Kapas. *Jurnal Sain Veteriner*, 35(1): 71-81.
- [9] Krisher RI. 2019. The Effect of Oocyte Quality on Development. *American Society of Animal Science*, 1(2): 1-13.
- [10] Wulandari TIP, Mahendra NB, Manuaba IF, Anyana IBP, Sudirman J. 2021. Kualitas Oosit, Embrio, dan Kehamilan Pasien Endometriosis Stadium III-IV dan Pasien dengan Infertilitas Tuba Falopii yang Mengikuti Program Bayi Tabung di Rumah Sakit Bros Tahun 2015-2019. *Jurnal Medika Udayana*, 10(3): 40-48.
- [11] Villasenor M, Coscioni AC, Galvao KN, Chebel RC, Santos JEP. 2018. Gossypol Disrupts Embryos Development in Heifers. *Dairy Sci*, 91(8):3015-3024. Doi:10.3168/jds.2007-0939.
- [12] Chandrashekar R, Kumar AK, Reddy YR, Chaitanya PJ, Bhavani NL, Pochampalli J. 2013. Isolation of Gossypol and Analysis of Phytochemicals in Seed Extract of BT and Non-BT Varieties of Cotton. *Pharm Phytochem*, 2(1):180-187.
- [13] AVMA [American Veterinary Medical Association]. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg (DE): Meacham Road Pr.
- [14] Supriatna I. 2013. *Transfer Embrio pada Ternak Sapi*. Bogor (ID): Seameo Biotrop. 2013.
- [15] Zayani N, Supriatna I, Setiadi MA. 2016 Efektivitas Ekstrak Biji Kapas (*Gossypium hirsutum* L.) terhadap Jumlah dan Viabilitas Embrio Mencit (*Mus musculus* L.). *Jurnal Sain Veteriner*, 34(2): 233-242.
- [16] Madihah, Kusumaningtyas H, Boediono A, Sumarsono, SH. 2016. Kualitas Kemampuan Implantasi dan Viabilitas In Vivo Embrio Mencit (*Mus musculus*) Galur Swiss Webster Setelah Pembekuan dengan Metode Vitrifikasi. *Jurnal Sain Veteriner*, 11(2): 72-79.
- [17] Setiawan B, Sehartono E. 2017. Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stress Oksidatif pada Bayi Premature. *Maj Koedokt Indon*, 57(1):1-8.
- [18] Velasquez-Pereira J, Risco CA, McDowell LR, Staples CR, Prichard D, Chenoweth PJ, Martin FG, Williams Sn, Rojas LX, Calhoun MC, Wilkinson NS. 2013. Long Term Effect of Feeding Gossypol and Vitamin E to Dairy Calves. *Dairy Sci*, 82(1):1240-1251.
- [19] Camara ACL, Gadelha ICN, Borges PAC, Paiva SA, Melo MM, Blanco BS. 2015. Toxicity of Gossypol from Cottonseed Cake to Sheep Ovarian Follicles. *Research article Plos One*, 10(11): 1-11. Doi: 10.1371/journal.pone.0143218.
- [20] Gadelha ICN, deMacedo MF, Melo MM, Blanco BB. 2014. Gossypol Promotes Degeneration of Ovarian Follicles in Rats. *Sci Word*, 14 (2): 1-7.