

## Efektivitas Ekstrak Biji Kapas (*Gossypium hirsutum* L.) terhadap Jumlah dan Viabilitas Embrio Mencit (*Mus musculus* L.)

### *Effectiveness of the Cottonseed Extract (*Gossypium hirsutum* L.) on the Quantity and Viability of Mice Embryo (*Mus musculus* L.)*

Nofri Zayani<sup>1</sup>, Iman Supriatna<sup>2</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 Indonesia

Email: iman\_sprtn@yahoo.com

#### Abstract

The cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) contained gossypol as antifertility agent. The effect of cottonseed extract treatment could be decrease and impaired follicles development were accompanied by oocytes damage. Damage of oocytes resulted reduction of number and viability of embryos. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of cottonseed extract (*Gossypium hirsutum* L.) on the number and viability of mice embryo (*Mus musculus* L.). Doses of the cottonseed extract were used consists of 0 (control), 1.5; 2.1; and 2.7 g/kg of body weight (BW) for 24 days via the oral route. This research used 24 animals healthy of female DDY mice 14-15 weeks old and 30-35 g BW. Embryos were collected at day 4 of pregnancy by flushing the utery cornua. The collected embryos were cultured in vitro for 48 hours in modified phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) culture medium according to the stage of its development to observe the viability of embryos. The result showed that the cottonseed extract with doses 1.5; 2.1; and 2.7 g/kg of body weight (BW) made the number of embryos which collected in D4 of pregnancy significantly lower than control ( $P < 0.05$ ). Data from embryos culture in vitro for 48 hours decreased embryos number ( $P < 0.05$ ) that developed in to the expanded and hatched blastocysts. At 2.7 g/kg BW, embryos only can develop to the blastocysts stage. Retardation (4-8 cells) and degeneration embryos did not develop in culture for 24 hours. It was concluded that the cottonseed extract decreased the number and viability of mice embryo.

**Keywords:** embryo numbers, gossypol, viability of mice embryo

#### Abstrak

Ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum* L.) mengandung gosipol yang bersifat sebagai zat antifertilitas. Efeknya mampu mengurangi dan merusak folikel berkembang yang disertai dengan kerusakan oosit. Kerusakan oosit ini mengakibatkan penurunan jumlah dan viabilitas embrio. Penelitian ini bertujuan mengkaji efektivitas ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum* L.) terhadap jumlah dan viabilitas embrio mencit (*Mus musculus* L.). Dosis ekstrak yang digunakan terdiri atas 0 (kontrol), 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg berat badan (BB) yang diberikan selama 24 hari per oral. Mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor betina DDY sehat, berumur 14-15 minggu, dan berat 30-35 g. Koleksi embrio dilakukan pada hari ke-4 (D4) kebuntingan dengan *flushing* kornua uterus. Embrio terkoleksi kemudian di kultur secara *in vitro* selama 48 jam dalam modifikasi medium *phosphate buffered saline* (PBS) yang disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS) berdasarkan stadium perkembangannya untuk mengamati viabilitas embrio. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak biji kapas dosis 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg BB mengakibatkan jumlah embrio yang dikoleksi pada D4 kebuntingan signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0.05$ ). Data hasil kultur secara *in vitro* embrio selama 48 jam menurunkan jumlah embrio ( $P < 0.05$ ) yang berhasil berkembang ke tahapan *expanded* dan *hatched* blastosis. pada dosis 2.7 g/kg BB, embrio hanya mampu berkembang sampai tahapan blastosis. Embrio *retarded* (4-8 sel) dan degenerasi

tidak berkembang pada 24 jam kultur. Disimpulkan bahwa ekstrak biji kapas menurunkan jumlah dan viabilitas embrio menci.

**Kata kunci:** gosipol, jumlah embrio, viabilitas embrio menci

## Pendahuluan

Penelitian dan pengembangan obat kontrasepsi herbal di Indonesia terus dikaji dan berkembang pesat. Obat herbal lebih banyak diminati oleh masyarakat saat ini karena bersifat *reversible*, efektif, mudah didapat dan ekonomis. Hal ini sesuai dengan syarat ideal untuk pemilihan kontrasepsi (Rusmiati, 2010). Selama ini, obat kontrasepsi banyak berasal dari bahan-bahan kimia termasuk hormon yang cukup membahayakan kondisi kesehatan masyarakat. Beberapa efek samping kontrasepsi di antaranya meningkatkan tekanan darah, mual, kegemukan, pendarahan di luar siklus menstruasi, dan resiko jantung koroner (Nawrot *et al.*, 2003). Oleh karena itu, eksplorasi bahan herbal kontrasepsi sangat diharapkan agar masyarakat tetap dapat mengatur jumlah anak tanpa harus memikirkan resiko penggunaan obat.

Biji kapas (*Gossypium hirsutum* L.) adalah salah satu bagian tumbuhan kapas yang berpotensi sebagai bahan obat kontrasepsi herbal. Tumbuhan kapas banyak dibudidayakan di Indonesia khususnya pada provinsi Jawa Tengah, Jawa Timur, Nusa Tenggara Barat (NTB), Nusa Tenggara Timur (NTT), Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara (Sahid dan Wahyuni, 2001). Biji kapas memiliki kandungan utama gosipol, yaitu suatu zat antifertilitas yang memengaruhi kontrol hormon reproduksi dan memiliki efek sitotoksik (Gadelha *et al.*, 2014a). Hernandez (2016) juga mengemukakan bahwa gosipol termasuk ke dalam senyawa polifenolik bersifat sitotoksik yang berwarna kuning. Efek antifertilitas gosipol telah diteliti mampu mengurangi jumlah folikel yang berkembang ke folikel besar ovarium (Gadelha *et al.*, 2014b). Mekanisme kerja gosipol diduga langsung merusak pada sel-sel folikel ovarium (Camara *et al.*, 2015).

Aktivitas sitotoksik gosipol pada sel-sel di ovarium diperkirakan dapat memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) (Kovacic, 2003) yang menghambat kerja antioksidan *superoxide* dismutase (SOD) sehingga menyebabkan stres oksidatif sel yang berdampak pada kerusakan komunikasi antara sel (Herve *et al.*, 1996 dan Cheng *et al.*, 2003) dan transpor ion melalui membran (Bai and Shi, 2002). Kerusakan parah pada sel yang diakibatkan gosipol dapat menginduksi apoptosis (Zanga *et al.*, 2003). Peningkatan oksigen reaktif ( $O_2^-$ ) mengakibatkan pengurangan produksi hormon steroid pada sel granulosa karena menekan kerja enzim-enzim kunci yang terlibat seperti aromatase,  $5\alpha$  reduktase, dan hidrokortikosteroid dehidrogenase sehingga disebut juga memiliki efek antisteroidogenik (Gu *et al.*, 1991; Basini *et al.*, 2009). Efek sitotoksik gosipol juga merusak mitokondria sehingga mengganggu metabolisme energi seluler (Yuan and Shi, 2000). Gosipol menghambat metabolisme oksidatif dengan menekan aktivitas enzim yang terlibat pada transpor elektron dan fosforilasi oksidatif (Gadelha *et al.*, 2014a). Disfungsi mitokondria mengakibatkan penurunan produksi *adenosine triphosphate* (ATP) untuk proses metabolisme sel (Neganova *et al.*, 2000).

Semua gangguan aktivitas seluler pada folikel ini mengakibatkan atresia yang diikuti dengan kerusakan sel oosit (Camara *et al.*, 2015). Kualitas oosit sangat menentukan kompetensi oosit untuk berkembang menjadi embrio khususnya sampai tahapan blastosis. Oleh karena itu, penelitian pemberian ekstrak biji kapas pada menci telah dilakukan untuk mengamati pengaruhnya terhadap kerusakan oosit lebih lanjut yang diindikasikan dengan penurunan jumlah embrio serta kemampuan perkembangan embrio yang dikultur secara *in*

*vitro*. Tujuan penelitian ini mengkaji efektivitas ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum* L.) terhadap jumlah dan viabilitas embrio mencit (*Mus musculus* L.). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait efek ekstrak biji kapas terhadap jumlah dan viabilitas embrio mencit yang dikultur secara *in vitro*, serta memberikan informasi kepada masyarakat tentang potensi biji kapas yang bermanfaat untuk bahan kontrasepsi herbal.

### Materi dan Metode

Biji kapas yang digunakan berasal dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (Balitas) Malang Provinsi Jawa Timur, panen umur 5 bulan, berbentuk bulat lonjong utuh, dan berwarna coklat kehitaman. Biji kapas yang kering digerus untuk diambil serbuk simplisianya. Simplisia diekstraksi dengan metode maserasi (perendaman) menggunakan etanol 80%. Hasil filtrasi dari perendaman simplisia kemudian dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga didapatkan serbuk ekstrak biji kapas. Serbuk ditimbang untuk menentukan randemen ekstrak biji kapas yang diperoleh dengan ekstraksi etanol 80%.

Mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor indukan betina DDY sehat, berumur 14 - 15 minggu, dan bobot rata-rata 30-35 g. Pemilihan mencit ini berdasarkan pada aspek reproduksinya yang masih bagus dengan ciri jumlah anakan 8 sampai 15 ekor/ indukan setiap kelahiran. Mencit diperoleh dari Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB kemudian diadaptasikan selama 2 minggu. Mencit diberi obat pra perlakuan berupa dosis tunggal obat cacing Combantrin® 1,4 g/kg BB pada minggu kedua adaptasi. Mencit ditempatkan dalam kandang tertutup kawat dan alas kandang berupa sekam kayu yang diganti dua kali seminggu. Setiap kandang diisi dengan lima ekor mencit betina. Ruangan yang digunakan bersuhu 23

- 27 oC dengan siklus terang pukul 06.00 - 18.00 dan gelap pukul 18.00 - 06.00 WIB. Pakan diberikan 5 g/ ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum* setiap hari. Pakan yang digunakan khusus untuk mencit produksi Indo Feed dengan komposisi nutrisi air 12%, protein kasar 23%, M.E Kcal 27,50%, lemak kasar 4%, serat kasar 5%, kalsium 1%, fosfor 0,8%, abu 8% dan protein DD 17%. Penelitian ini telah mendapat persetujuan perlakuan etik hewan dengan nomor 14-2016 IPB.

Pemberian ekstrak pada mencit dilakukan setiap hari pukul 08.00 WIB secara oral sesuai dosis perlakuan selama 24 hari. Dosis ekstrak yang diberikan pada mencit masing-masing 0, 1.5; 2.1 dan 2.7 g/kg BB. Ekstrak biji kapas diberikan dalam bentuk larutan suspensi dengan menghomogenkan serbuk ekstrak dalam Na-Carboxy Methyl Selulose (NA-CMC) 0.2%. Setelah 24 hari pemberian ekstrak biji kapas, mencit dikawinkan secara alami dengan mencit jantan. Teknik pengawinan dilakukan dengan menempatkan empat ekor betina ke dalam suatu kandang yang berisi satu ekor mencit jantan. Mencit jantan yang digunakan terlebih dahulu dipastikan termasuk baik reproduksinya yaitu memiliki libido yang bagus (mau mengejar dan menaiki betina). Penempatan mencit betina dan jantan dilakukan mulai pukul 16.30 WIB selama  $\pm$  satu minggu. Terjadinya koitus (hari pertama (D1) kebuntingan) diamati melalui keberadaan sumbat vagina pada besok paginya. Mencit yang telah koitus dipelihara terpisah dari mencit yang belum koitus. Mencit yang tidak ditemukan sumbat vagina tetap dibiarkan sekandang dengan jantan sampai terjadi koitus.

Pengambilan data dilakukan pada hari ke-4 (D4) kebuntingan mencit dengan cara dislokasi servikalis (AVMA Guidelines, 2013). Koleksi embrio dilakukan dengan metode pembilasan (*flushing*) pada masing-masing kornua uterus dengan 1 ml medium koleksi *modified phosphate buffered saline* (PBS) yang disuplementasi 5% *fetal bovine*

*serum* (FBS) menggunakan spuit berjarum tumpul ukuran 18 G. Modifikasi medium yang digunakan terdiri atas 1 g glukosa, 4 g *bovine serum albumine* (BSA), 36 mg *NA-pyruvate*, *penicillin* 100.000 IU, dan *streptomycin* 100 mg. Setiap kornua uterus dibilas dari arah *bifurcatio* ke *apex cornua* uteri. Hasil bilasan ditampung dalam petri *dish* yang telah berisi medium koleksi. Embrio kemudian diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah embrio dengan menghitungnya langsung di bawah mikroskop.

Embrio terkoleksi yang sesuai dengan stadium perkembangannya pada D4 kebuntingan yaitu morula, morula kompak, blastosis awal, dan blastosis dikultur secara *in vitro* selama 48 jam. Pengamatan stadium perkembangan embrio pada hari keempat kebuntingan mencit berdasarkan pemeriksaan morfologis dan penghitungan jumlah sel blastomer menurut Theiler (1989) dan Supriatna *et al.*, (1993). Embrio berstadium morula jika sudah terdiri atas lebih dari 16 sampai 32 sel blastomer dan berstadium morula kompak jika sel morula yang terbentuk sudah kompak serta sulit untuk menghitung jumlah sel blastomernya. Embrio berstadium blastosis awal jika sudah terbentuk rongga blastosol yang menempati kurang dari setengah volume embrio. Embrio berstadium blastosis jika blastosol yang terbentuk menempati setengah volume embrio atau lebih.

Kultur embrio dilakukan dalam petri *dish* (Nunc) berisi 2 ml medium *modified* PBS yang disuplementasi 10% FBS untuk 10-15 embrio di dalam inkubator suhu 37 oC dengan kondisi udara 5% CO<sub>2</sub> (Supriatna *et al.*, 1993). Pengamatan perkembangan embrio secara *in vitro* dilakukan setiap 24 jam hingga jam ke-48. Penggantian medium kultur dilakukan setiap 24 jam. Viabilitas embrio diamati dengan menghitung persentase perkembangan embrio morula dan morula kompak ke tahap blastosis awal, blastosis, *expanded* blastosis,

*hatching* blastosis; serta perkembangan embrio blastosis awal dan blastosis ke tahap *expanded* blastosis, *hatching* blastosis, *hatched* blastosis; dan embrio degenerasi (mati).

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 ulangan dan 4 perlakuan (dosis). Data disidik dengan analisis varian (ANOVA), perbedaan hasil ANOVA dilakukan uji lanjut Duncan *multiple range test* (DMRT) pada  $\alpha = 5\%$ . Data diolah menggunakan program SPSS Versi 16.

## Hasil dan Pembahasan

### Jumlah Embrio Mencit pada D4 Kebuntingan

Data hasil penelitian pemberian ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum* L.) peroral selama 24 hari terhadap perolehan jumlah embrio mencit terlihat pada Tabel 1. Pemberian ekstrak biji kapas mengakibatkan jumlah embrio yang berhasil dikoleksi pada D4 kebuntingan mencit signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $P < 0.05$ ). Pemberian ekstrak biji kapas dosis 1.5 dan 2.1 g/kg BB memberikan efek yang sama terhadap penurunan jumlah embrio. Dosis 2.7 g/kg BB mengakibatkan penurunan drastis jumlah embrio dibandingkan kelompok dosis 1.5; 2.1 g/kg BB, dan kontrol ( $P < 0.05$ ). Jumlah embrio per indukan tertinggi terdapat pada kelompok kontrol yaitu 12 embrio, sedangkan terendah terdapat pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB yaitu 4 embrio. Pada kelompok dosis ini ditemukan sekitar 25% terdiri atas oosit yang tidak terfertilisasi. Jumlah embrio total menurun terjadi seiring dengan peningkatan dosis ekstrak biji kapas yang diberikan yaitu 63 (kontrol), 49 (1.5 g/kg BB), 41 (2.1 g/kg BB), dan 30 (2.7 g/kg BB) embrio.

Penurunan perolehan jumlah embrio diduga terjadi akibat penurunan jumlah dan folikel yang atresia. Pada penelitian Camara *et al.*, (2015) ditemukan pengurangan jumlah folikel yang hidup dan berkembang pada domba setelah pemberian

Tabel 1. Jumlah embrio mencit yang berhasil dikoleksi pada D4 kebuntingan

Perlakuan (g/kg BB)	n (mean $\pm$ std)
Kontrol (0)	63 (11 $\pm$ 1.7) <sup>a</sup>
1.5	49 (8 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>
2.1	41 (7 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>
2.7	30 (7 $\pm$ 0.9) <sup>c</sup>

Keterangan : *Superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ ). (n = jumlah embrio, mean = rata-rata jumlah embrio per indukan, std = standar deviasi).

gosipol 1.5% pada pakan selama 63 hari. Kejadian serupa juga terjadi pada mencit, bahwa pemberian ekstrak biji kapas yang mengandung gosipol dengan dosis 2.7 g/kg selama 24 hari menurunkan jumlah folikel antral khususnya folikel tersier (Ramadhani, 2016). Lebih lanjut, penelitian Gadelha *et al.*, (2015b) menemukan bahwa pemberian gosipol pada tikus tidak hanya mengakibatkan penurunan jumlah folikel yang berkembang, namun juga meningkatkan jumlah folikel atresia pada semua tahapan perkembangan. Folikel atresia ini banyak ditemukan pada mencit yang telah diberikan ekstrak biji kapas selama 24 hari dibandingkan dengan kontrol (Ramadhani, 2016). Folikel primer dan primordial yang atresia berdampak terhadap pengurangan jumlah oosit yang diovulasikan sehingga mengurangi jumlah embrio yang dihasilkan (Gadelha *et al.*, 2014b). Oleh karena itu, jumlah embrio dari indukan yang diberikan ekstrak biji kapas lebih rendah dibandingkan kontrol dan penurunannya terjadi seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan pada mencit. Sedangkan atresia pada folikel antral mengakibatkan penurunan kualitas dan kompetensi oosit yang dihasilkan dengan ditandai adanya pengerutan struktur oosit, nukleusnya piknotik, dan juga terjadi kerusakan lapisan kumulus sehingga ikut serta menurunkan kualitas embrio yang dihasilkan (Sirard *et al.*, 2006). Selain itu, gosipol dapat secara langsung menghambat maturasi inti oosit dengan menahan proses meiosis agar tetap berada pada

tahapan diploten prophase I (Lin *et al.*, 1994). Gosipol juga mengganggu maturasi sitoplasma oosit dengan menghambat perkembangan retikulum endoplasma halus dan meningkatkan jumlah lisosom dalam ooplasma (Pan *et al.*, 1987). Hal ini mengakibatkan penurunan kualitas oosit sehingga hanya sedikit yang mampu difertilisasi. Rendahnya kualitas oosit yang dihasilkan menyebabkan kegagalan oosit untuk dibuahi atau disebut dengan oosit yang tidak terfertilisasi. Oleh karena itu, pada pemberian ekstrak biji kapas dengan dosis 2.7 g/kg BB diduga mengakibatkan terjadinya kerusakan pada oosit sehingga pada koleksi embrio di hari keempat kebuntingan ditemukan sekitar 25% terdiri atas oosit yang tidak terfertilisasi.

#### Viabilitas Embrio yang Dikultur secara *In Vitro*

Penentuan viabilitas embrio dengan kultur secara *in vitro* penting dilakukan untuk membuktikan kemampuan perkembangan embrio yang dihasilkan setelah indukan diberi ekstrak biji kapas peroral selama 24 hari. Kultur embrio dilakukan pada morula, kompak morula, blastosis awal, dan blastosis. Persentase perkembangan embrio dari tahapan morula, kompak morula, blastosis awal dan blastosis mencit yang berkembang setelah 48 jam kultur terlihat pada Gambar 1. Pemberian ekstrak biji kapas signifikan menurunkan perkembangan embrio yang dikultur *in vitro* selama 48 jam ( $P < 0.05$ ) seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan pada mencit. 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 pada kelompok dosis 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg BB dibandingkan dengan kontrol. Pemberian ekstrak biji kapas dengan dosis 1.5 g/kg BB dan 2.1 g/kg BB memberikan efek yang sama terhadap penurunan perkembangan embrio mencapai *expanded* blastosis pada 24 jam kultur dan *hatching* blastosis serta

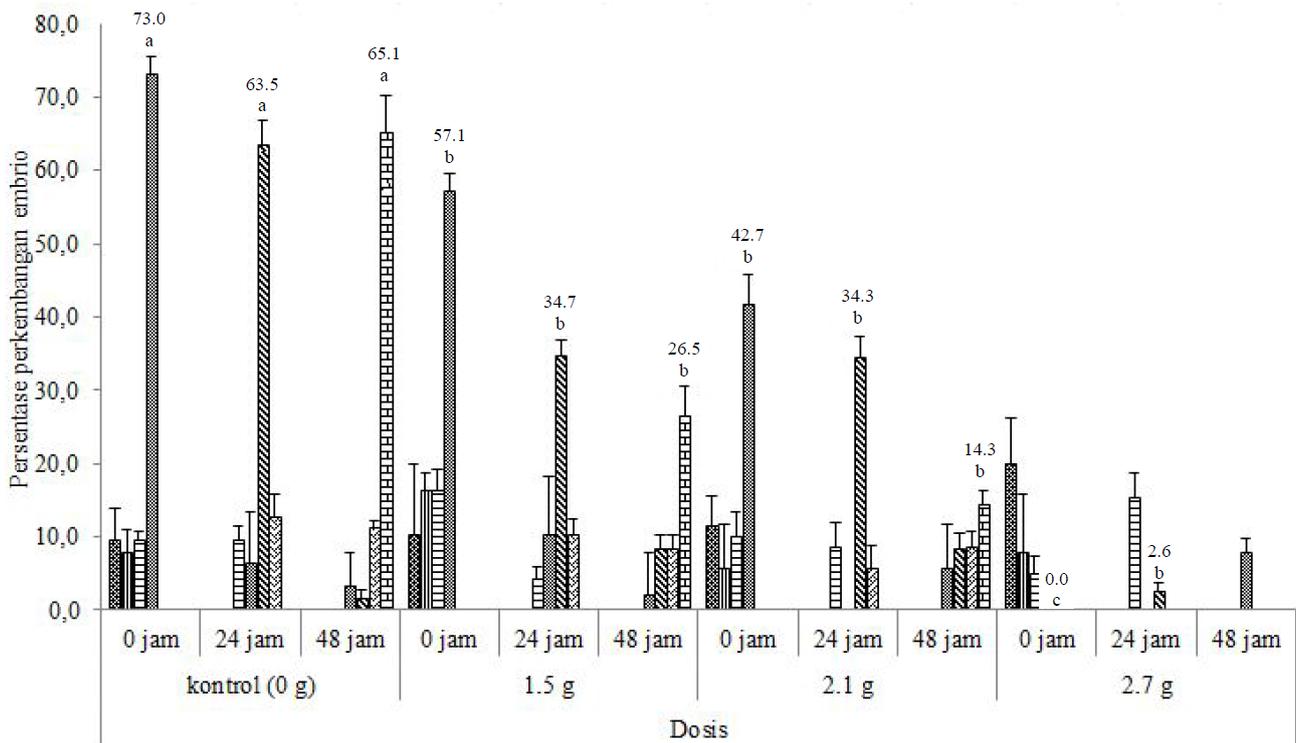
*hatched* blastosis selama 48 jam kultur. Pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB terjadi penurunan yang drastis pada embrio yang berhasil berkembang setelah kultur 48 jam ( $P < 0.05$ ). Pada kelompok dosis ini, embrio hanya berhasil berkembang sampai tahapan blastosis setelah kultur 48 jam. Embrio ini diduga tidak akan dapat berkembang ke tahapan selanjutnya karena pada 48 jam kultur sejak dikoleksi dari hari keempat kebuntingan (enam hari kebuntingan mencit) seharusnya embrio sudah *hatched* dan mulai implantasi pada dinding uterus secara *in vivo* atau menempel pada permukaan petri dish pada kultur secara *in vitro*. Said *et al.*, (2011) juga mengemukakan bahwa kelangsungan hidup embrio mencit pada tahapan selanjutnya sangat bergantung dari keberhasilan hidup embrio pada tahapan preimplantasi (sampai tahapan *hatched* blastosis). Oleh karena itu, embrio mencit yang tidak berkembang sampai *hatched* blastosis pada tahapan preimplantasi diperkirakan tidak akan mampu berkembang lanjut dan implantasi.

Hasil pengamatan terhadap total persentase perkembangan embrio yang berkembang pada kultur *in vitro* selama 48 jam disajikan pada Tabel 2. Persentase embrio mencit kelompok kontrol yang mampu berkembang ke tahapan selanjutnya tidak signifikan menurun pada kultur secara *in vitro* selama 48 jam ( $P > 0.05$ ). Pemberian ekstrak biji kapas dosis 1.5; 2.1; dan 2.7 g/kg BB signifikan menurunkan persentase embrio yang berkembang dari 0 jam menuju 24 jam ( $P < 0.05$ ). Sementara itu, kultur embrio dari 24 menuju 48 jam hanya menurunkan kemampuan embrio untuk berkembang ke tahapan *hatching* dan *hatched* blastosis secara tidak nyata ( $P > 0.05$ ).

Penurunan perkembangan embrio melalui kultur secara *in vitro* berkaitan dengan penurunan stadium perkembangannya pada D4 kebuntingan. Supriatna *et al.*, (1993) menemukan pada D4 kebuntingan mencit, embrio semestinya berstadium morula sampai dengan blastosis. Hasil penelitian

memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak biji kapas mengakibatkan hambatan pada perkembangan embrio mencit. Hal ini terbukti pada dosis 2.7 g/kg BB ditemukan oosit yang tidak terfertilisasi (25.0%), degenerasi (20.0%), dan *retarded* perkembangan (8 sel) (25.0%) pada D4 kebuntingan, sedangkan perolehan morula (20.0%), morula kompak (7.5%), blastosis awal (2.5%), dan tidak ada embrio tahapan blastosis (0.0%). Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian pada sapi bahwa gosipol 2 g/kg BB selama 70 hari juga mengakibatkan peningkatan oosit tidak terfertilisasi, degenerasi dan pengurangan persentase embrio yang berkembang menuju blastosis (Villasenor *et al.*, 2008). Embrio degenerasi dan *retarded* juga ditemukan pada kelompok dosis 2.1 g/kg BB. Embrio normal yang sesuai stadium dengan tahapan perkembangannya memiliki kemampuan perkembangan yang tinggi walaupun melalui kultur secara *in vitro* (Galvao *et al.*, 2006). Hal ini sesuai dengan data hasil penelitian bahwa persentase embrio yang dikultur secara *in vitro* selama 48 jam masih memiliki kemampuan perkembangan yang tinggi pada kelompok kontrol (79.4%) dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 1.5 (42.9%); 2.1 (19.5%); dan 2.7 g/kg BB (7.5%) setelah kultur selama 48 jam (Tabel 2).

Pemberian ekstrak biji kapas secara signifikan menurunkan persentase embrio yang berkembang dari kultur 0 jam menuju 24 jam seperti terlihat pada Tabel 2. Pada 0 jam (D4 koleksi) embrio banyak tergolong embrio degenerasi sehingga gagal dalam berkembang ke-24 jam. Persentase embrio yang berkembang setelah 48 jam semakin rendah pada kelompok dosis 2.7 g/kg BB karena embrio tidak hanya mengalami degenerasi, tetapi juga *retarded* perkembangan (4 sampai 8 sel) pada D4 kebuntingan mencit. Hambatan kemampuan embrio berkembang ke tahapan lebih lanjut disebabkan oleh kurangnya kompetensi oosit (Sirrard *et al.*, 2006). Kerusakan pada oosit mengakibatkan kematian embrio dini



Gambar 1. Persentase embrio dari morula, morula kompak, blastosis awal, dan blastosis mencit yang berkembang setelah kultur *in vitro* selama 48 jam. ■ k 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 ( $P < 0.05$ ).

Tabel 2. Total persentase embrio mencit yang berkembang setelah kultur secara *in vitro* setelah 48 jam

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

Keterangan : *Superscript* yang berbeda pada baris yang sama menyatakan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ ). (n = jumlah, % = persentase embrio, dan std = standar deviasi).

sebelum tahapan 16 sel (Nasim *et al.*, 1995). Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio degenerasi dan *retarded* yang dikultur 24 jam gagal berkembang ke tahapan selanjutnya. Berdasarkan data penelitian yang disajikan pada Tabel 2, penurunan kemampuan perkembangan embrio mencit secara tidak nyata terjadi dari kultur 24 jam ke-48 jam. Embrio yang masih berkembang baik ketika dilanjutkan kultur sampai 48 jam kemungkinan berasal dari oosit yang masih berkualitas bagus dan nutrisi dari dalam

medium serta kondisi lingkungan yang digunakan mendukung perkembangannya. Nutrisi merupakan komponen penting yang mendukung perkembangan embrio preimplantasi (Said *et al.*, 2011). Penelitian Supriatna *et al.*, (1993) menemukan bahwa medium *mPBS* yang disuplementasikan FBS yang juga digunakan dalam penelitian ini mampu mendukung perkembangan embrio mencit sampai ke tahapan *hatched* blastosis dengan persentase viabilitasnya mencapai 88.9%.

Kemampuan perkembangan embrio sangat bergantung pada keadaan oosit yang dihasilkan. Embrio yang berasal dari folikel atresia memiliki tingkat perkembangan yang rendah karena oosit yang dihasilkan telah rusak sehingga mengurangi kompetensinya (Camara *et al.*, 2015). Kompetensi oosit menentukan kemampuan perkembangan embrio ke tahapan blastosis (Cecconi, 2002; Lonergan *et al.*, 2001; Serrard *et al.*, 2006). Semakin tinggi dosis ekstrak biji yang diberikan mengakibatkan semakin rendahnya persentase perkembangan embrio. Data dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa embrio yang dapat berkembang baik selama 48 jam kultur adalah blastosis dibandingkan morula, morula kompak, dan blastosis awal. Hal ini diduga karena embrio tahapan blastosis berasal dari oosit yang tidak rusak oleh ekstrak biji kapas atau masih berkualitas baik sehingga masih mendukung perkembangan lanjut. Perkembangan lanjutan embrio blastosis yang berkualitas baik mampu mencapai ke tahapan lebih lanjut yaitu *expanded*, *hatching*, dan *hatched* blastosis seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

Pemberian ekstrak biji kapas juga mengakibatkan embrio tahap morula dan morula kompak sedikit yang berkembang sampai *hatching* blastosis setelah dikultur 48 jam. Gordon (2003) mengemukakan bahwa perkembangan morula menuju morula kompak adalah tahapan perkembangan penting yang mendukung pembentukan blastosis seperti pembentukan *tight junction* yang penting untuk ekspansi blastosol. Lin *et al.*, (1992) mengemukakan bahwa akumulasi gosipol dapat merusak *tight junction* sehingga mengganggu komunikasi antar sel dan mengakibatkan ikatan antara blastomer menjadi tidak kompak seperti dengan ditemukannya morula yang degenerasi. Oleh karena itu gosipol mengurangi morula yang berkembang sampai kultur 48 jam. Hasil penelitian juga menunjukkan dosis ekstrak biji kapas 1.5 g/kg BB dan 2.1 g/kg BB belum efektif mempengaruhi jumlah dan menghambat perkembangan embrio karena masih

terlihat ada embrio yang mampu berkembang sampai *hatched* blastosis.

Mekanisme penurunan jumlah dan viabilitas embrio serta hambatan perkembangan embrio ini berkaitan dengan kerusakan yang terjadi pada proses pembentukan sel gamet. Gosipol lebih banyak merusak pada sel penghasil gamet dan gamet yaitu sel-sel folikel ovarium dan oosit. Akumulasi gosipol pada konsentrasi tinggi banyak ditemukan pada antrum folikel (Velasquez-Pereira *et al.*, 2002). Efek sitotoksik gosipol langsung mengganggu perkembangan folikel ovarium khususnya folikel yang aktif berkembang seperti folikel primordial dan primer (Camara *et al.*, 2015). Efek sitotoksik terjadi berawal saat gosipol berikatan dengan fosfolipid dan lipoprotein membran sehingga mengubah susunan lipid yang mengakibatkan terganggunya permeabilitas membran. Gosipol juga menempati saluran  $Ca^{2+}$  tipe T pada membran yang mengakibatkan terganggunya influks  $Ca^{2+}$  dan transpor ion lainnya ke dalam sitoplasma (Brocas *et al.*, 1997; Bai and Shi, 2002). Selain itu, gosipol memicu pembentukan senyawa oksigen reaktif ( $O_2^-$ ) yang menyebabkan peroksidasi lipid membran dan stress oksidatif sel. Serangkaian mekanisme ini merusak perkembangan folikel yang akhirnya juga berdampak terhadap penurunan jumlah dan viabilitas embrio.

## Kesimpulan

Berdasarkan data yang terkompilasi dari hasil penelitian disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji kapas menurunkan jumlah embrio mencit. Hasil penelitian lanjut, viabilitas embrio mencit yang terbentuk setelah kultur secara *in vitro* selama 48 jam lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Dosis yang efektif dalam penelitian ini adalah 2.7 g/kg BB. Berdasarkan efek yang ditimbulkan, ekstrak biji kapas memiliki zat antifertilitas dan dapat diklasifikasikan sebagai bahan kontrasepsi herbal. Penelitian ini perlu

ditindak lanjuti berupa peningkatan dosis ekstrak biji kapas agar tidak dihasilkan embrio.

### Daftar Pustaka

- AVMA [American Veterinary Medical Association]. (2013). *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Penerbit Meacham Road Pr. Schaumburg: 38-39.
- Bai, J. and Shi Y. (2002). Inhibition of T-type  $Ca^{2+}$  currents in mouse spermatogenic cells by gossypol, an antifertility compound. *Eur. J. Pharmacology*. 440:1-6.
- Basini, G., Bussolati, S., Baioni, L. and Grasselli, F. (2009). Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant interferes with swine granulosa cell function. *Dom. Anim. Endocrinol.* 37:30-36.
- Brocas, C., Rivera, M. R., Paula-Lopes, F. F., McDowell, L. R., Calhoun, M. C., Staples, C. R., Wilkinson, N. S., Boning, A. J., Chenoweth, P. J. and Hansen, P. J. (1997). Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and embryos. *Biol. Reprod.* 57:901-907.
- Camara, A. C. L., Gadelha, I. C. N., Borges, P. A. C., Paiva, S. A., Melo, M. M. and Blanco, B. S. (2015). Toxicity of gossypol from cottonseed cake to sheep ovarian follicles. *Research Article Plos One*. 10:1-11.
- Cecconi, S. (2002). Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspective. *Reprod. Dev.* 48: 431-445.
- Cheng, J. S., Lo, K. Y., Yeh, J. H., Cheng, H. H., Liu, C. P., Chen, W. C. and Jan, C. R. (2003). Effect of gossypol on intracellular  $Ca^{2+}$  regulation in human hepatoma cells. *Chin. J. Physiol.* 46: 117-122.
- Gadelha, I. C. N., Fonsesa, N. B. S., Oloris, S. C. S., Melo, M. M. and Blanco, S. B. (2014a). Gossypol toxicity from cottonseed products. *Sci. World*. 14:1-9.
- Gadelha, I. C. N., deMacedo, M. F., Melo, M. M. and Blanco, B. B. (2014b). Gossypol promotes degeneration of ovarian follicles in rats. *Sci. World*. 14: 1-7.
- Galvao, K. N., Santos, J. E. P., Coscioni, A. C., Juchem, S. O., Chebel, R. C., Sisco, W. M. and Villasenor, M. (2006). Embryo survival from gossypol feed heifers after transfer to lactating cows treated with human chorionic gonadotropin. *Dairy. Sci.* 23:123-131.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos* 2<sup>nd</sup> ed. Penerbit CABI Publishing. Willingford. 225-226.
- Gu, Y., Lin, Y. C. and Rikihisa, Y. (1991). Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* 61:169-179.
- Hernandez, E. (2016). Cottonseed. *Article Food. Sci.* 1:1-5.
- Herve, J. C., Bastide, F. P. B., Cronier, L., Verrecchia, F., Malassine, A. and Joffre, M. (1996). Contraceptive gossypol blocks cell to cell communication in human and rat cells. *Eur. J Pharm.* 313: 242-255.
- Kovacic, P. (2003). Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *J. Curr. Medic. Chem.* 10: 2711-2718.
- Kurniawati, H. (2010). Hubungan pemakaian kontrasepsi pil KB kombinasi dengan tekanan darah tinggi pada wanita pasangan usia subur di Puskesmas Kecamatan Grogol Petamburan Kota Administrasi Jakarta Barat tahun 2010. Tesis. Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia, Depok.
- Lin, Y. C., Gu, Y., Brueggemeier, R. W. and Rikihisa, Y. (1992). Binding of 3H-Gossypol in organelles of cultured bovine luteal cells. *Life. Sci.* 50:443-447.
- Lin, Y. C., Sanbuissho, A., Coskun and Rikihisa, Y. (1994). Inhibition of in vitro fertilization and early embryonic development in hamsters by gossypol. *Life Sci.* 55:14-19.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. and Boland, M. P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 427-437.

- Nawrot, T. S., Hond, E. D., Fagard, R. H., Hoppenbrouwers, K. and Staessen, J. A. (2003). Blood pressure, serum total cholesterol, and contraceptive pill use in 17 year old girls. *Eur Cardiovasc Prevention Rehab.* 10:438-442.
- Nasim, A., Schrick, F. N., Butcher, R. L. and Inskip, E. K. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cow. *Biol Reprod.* 52:1129-1135.
- Neganova, I. E. G. G., Sekirina and Ritter, U. E. (2000). Surface-expressed E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 454-46.
- Pan, L. C., Nadakavukaren, M. J. and Jensen, D. R. (1987). Effect of ingested gossypol on the ultrastructure of rat ovarian follicles. *Cell. Tiss. Res.* 250:215-220.
- Ramadhani, S. A. (2016). Pengendalian folikulogenesis ovarium mencit (*Mus musculus*) dengan pemberian ekstrak biji kapas (*Gossypium hirsutum*). *Tesis.* Institut Pertanian Bogor. Bogor: 24.
- Rusmiati. (2010). Pengaruh ekstrak methanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) pada struktur mikroanatomi ovarium dan uterus mencit (*Mus musculus* L.) betina. *Sains Terap Kim.* 4: 29-37.
- Sahid, M. dan Wahyuni, S. A. (2001). Kapas: Keragaan dan Konsep Perbaikan Pengembangan Kapas Di Indonesia. Penerbit Balittas. Malang: 1-16.
- Said, S., Astirin, O. P. dan Wahyuningsih, S. (2011). Tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio mencit yang diberi ekstrak buah merah. *Med Petern.* 34: 112-116.
- Sirard, M. A., Richard, F. O., Blondin, P. And Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 65:126-136.
- Supriatna, I., Tolihere, M. R., Yusuf, T. L. dan Purwantara, B. (1993). Pengaruh penambahan fetal serum, calf serum, dan bovine serum dalam pupukan in vitro terhadap viabilitas embrio mencit. *Laporan Penelitian.* Institut Pertanian Bogor. Bogor: 23.
- Theiler, K. (1989). *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development.* Penerbit Springer Verlag Inc. Switzerland: 2-12.
- Velasquez-Pereira, J., Risco, C. A., McDowell, L. R., Staples, C. R., Prichard, D., Chenoweth, P. J., Martin, F. G., Williams, S. N., Rojas, L. X., Calhoun, M. C. and Wilkinson, N. S. (2002). Long term effect of feeding gossypol and vitamin E to dairy calves. *Dairy Sci.* 82:1240-1251.
- Villasenor, M., Coscioni, A. C., Galvao, K. N., Chebel, R. C. and Santos, J. E. P. (2008). Gossypol disrupt embryos development in Heifers. *Dairy. Sci.* 91: 3015-3024.
- Yuan, Y. Y. and Shi, Q. X. (2000). Inhibition of hamster sperm acrosomal enzyme by gossypol is closely associated with the decrease in fertilization capacity. *Contraception.* 62: 203-209.
- Zanga, M., Liua, H., Guoa, R., Ling, Y., Wu, X. and Lia, B. (2003). Molecular mechanism of gossypol induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharm.* 66:245-251.