



MENGENAL MENCIT SEBAGAI HEWAN LABORATORIUM

Mencit sebagai hewan uji di laboratorium sangat dikenal luas oleh para peneliti. Namun informasi lengkap mengenai mencit masih langka. Sehingga perlu ditulis berbagai informasi terkait mengenai mencit baik dari tinjauan umum, macam strain, kedudukan taksonominya, teknik pemeliharaan, anatomi dan fisiologi, teknik pemberian simpsia dan pengambilan darah. Buku mengenai mencit sebagai hewan percobaan ini disusun untuk mengisi kelangkaan buku-buku mengenai pengetahuan dan teknik penanganan mencit sebagai hewan uji yang banyak dibutuhkan di penelitian laboratorium. Buku ini berisi uraian mengenai seluk-beluk mengenai mencit, teknik-teknik pemberian sedian atau simpsia, teknik penyuntikan, teknik pengambilan sampel darah, teknik anestesi mencit. Selain sebagai pegangan bagi mahasiswa, laboran atau dosen yang sedang melakukan penelitian dengan hewan percobaan, buku ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber referensi. Diharapkan buku ini dapat menunjang penelitian di dalam bidang, biologi, anatomi, farmasi, patofisiologi, toksikologi maupun embriologi.



Rudy Agung Nugroho, penulis adalah alumnus Fakultas Biologi (Sekarang Fakultas Teknobiologi) Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Melanjutkan program magister (S2) di program Pascasarjana Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta tahun 2001 melalui beasiswa DUE LIKE Project.

Pada tahun 2014, telah menyelesaikan studi Doktorat dari Faculty of Science and Engineering di Curtin University, Perth Western Australia dengan beasiswa DIKTI. Saat ini adalah dosen tetap di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman Samarinda. Mengampu mata kuliah fisiologi hewan dan struktur perkembangan hewan. Beberapa publikasi internasional terindeks Scopus telah diterbitkan dan pernah mengikuti seminar internasional di Praha, Czech Republic dan Melbourne, Australia sebagai pembicara utama dan berbagai seminar internasional lainnya. Ini merupakan buku keempat yang ditulis dan diterbitkan. Buku-buku tersebut adalah Mudah membuat referensi dan bibliografi; Reproduksi Perkembangan Hewan; dan Dasar-dasar Endokrinologi. Semoga karya-karya berikutnya dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan.



MENGENAL MENCIT SEBAGAI HEWAN LABORATORIUM

RUDY AGUNG NUGROHO

MENGENAL MENCIT SEBAGAI HEWAN LABORATORIUM

RUDY AGUNG NUGROHO



**Mulawarman
University PRESS**

MENGENAL MENCIT SEBAGAI HEWAN LABORATORIUM



RUDY AGUNG NUGROHO



MENGENAL MENCIT SEBAGAI HEWAN LABORATORIUM

Penulis : Rudy Agung Nugroho

Editor & Cover Design: Andi Hafitz Khanz

ISBN : 978-602-6834-XX-X
© 2018. Mulawarman University Press

Edisi : Agustus 2018

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

Isi diluar tanggung jawab percetakan.

Nugroho, Rudy Agung. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium.*

Mulawarman University Press. Samarinda



**Mulawarman
University PRESS**

Penerbit

Mulawarman University PRESS

Gedung LP2M Universitas Mulawarman

Jl. Krayan, Kampus Gunung Kelua

Samarinda – Kalimantan Timur – INDONESIA 75123

Telp/Fax (0541) 747432, Email : mup.unmul@gmail.com

Terima kasih:

Istri dan anak-anakku tercinta, Anna Sari, Manda, dan Perth.

Atas segala kesabaran, pengertian, dukungannya dalam pekerjaan. Kepada orang tua terkasih, saudara, atas dukungan dan doa yang tiada akhir

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR TABEL

PRAKATA

BAB 1 SEKILAS MENCIT	1
BAB 2 STRAIN MENCIT	7
BAB 3 KEDUDUKAN TAKSONOMI.....	12
BAB 4 PEMELIHARAAN MENCIT	15
A.Kandang mencit	15
B. Pakan.....	18
C. Tempat pakan dan minum	21
D.Mengawinkan mencit.....	23
E. Gestasi mencit	32
F. Jumlah anak mencit sekelahiran.....	33
G. Penyakit pada mencit.....	37
BAB 5 ANATOMI MENCIT	40
A. Terminologi umum.....	40
B. Sistem respirasi.....	41
C.Sistem pencernaan.....	43
D. Sistem limfatik.....	47
E. Sistem urinaria.....	50
H. Sistem kardiovaskuler	54
I. Sistem skeletal	56
J. Sistem reproduksi	57
BAB 6 MENCIT DALAM PENELITIAN.....	64
A. Prosedur umum.....	64

B. Menandai mencit (Tagging)	65
C. Prosedur memegang mencit	71
BAB 7 PENGAMBILAN DARAH MENCIT	73
A. Pengambilan darah dari vena lateral di ekor	74
B. Pengambilan darah dari vena saphena kaki.....	75
C. Pengambilan darah intrakardial.....	76
D. Pengambilan darah dari sinus orbital mata	76
BAB 8 TEKNIK PEMBERIAN SIMPLISIA	78
A. Pemberian secara oral	78
B. Subkutan	79
C. Intravena	79
D. Intraperitoneal	80
E. Intramuskular	81
F. Volume maksimal injeksi	81
BAB 9 TEKNIK PENGAMBILAN DARAH	87
A. Hitung eritrosit	88
B. Hitung leukosit	91
C. Hitung differensial leukosit	92
D. Hitung hemoglobin.....	93
E. Hitung PCV.....	95
F. Hitung Mean Corpuscular Volume (MCV).....	96
BAB 10 TEKNIK EUTHANASIA, ANESTESI dan	
ANALGESIA	97
A. Euthanasia secara fisik	98
B. Euthanasia farmakologik non-inhalan.....	98
C. Euthanasia dengan zat anestetik inhalan	99
D. Euthanasia dengan gas non anestetik	99
E. Euthanasia dengan zat-zat transkuiliser.....	100

F. Anestesia.....	102
G. Analgesia	106
BAB 11 MEMBEDAH MENCIT.....	108
A. Perlengkapan dan material	109
B. Nekropsi umum	110
C. Nekropsi histopatologi.....	111
BAB 12 SPERMATOZOA MENCIT.....	114
A. Spermatogenesis	114
B. Konsentrasi sperma	121
C. Motilitas dan kecepatan gerak spermatozoa.....	122
D. Morfologi dan viabilitas spermatozoa	125
E. MAR Test	128
F. Test Hipoosmotic Swelling (HOS).....	131
G. Cryopreservasi spermatozoa mencit.....	133
BAB 13 OVARIUM MENCIT	138
A. Oogenesis	138
B. Transplantasi ovarium mencit	139
C. Vitrifikasi ovarium mencit	140
D. Superovulasi	144
BAB 14 EMBRIOLOGI MENCIT	148
A. Perkembangan awal embrio mencit.....	148
B. Perkembangan lanjut embrio mencit	152
C. Cryopreservasi embryo mencit.....	156
D. In vitro fertilization (IVF) pada mencit	158
BAB 15 PENELITIAN KANKER PADA MENCIT	161
A. Tranplantasi jaringan tumor pada mencit.....	162
B. Induksi dengan Benzo(a)pyren.....	163
C. Induksi dengan Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) .	163

D. Induksi dengan Dimethylhidrazine.....	164
BAB 16 MENCIT TRANSGENIK	165
A. DNA mikroinjeksi	165
B. Transfer gen dengan perantara retrovirus.....	166
C. Stem sel embrionik	167
BAB 17 ETIKA HEWAN (ANIMAL ETHICS).....	170
DAFTAR KEPUSTAKAAN	177

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Penggunaan hewan dalam penelitian.....	2
Gambar 2.	Contoh karakteristik strain mencit.....	10
Gambar 3.	Model kandang mencit dari boks plastik.....	16
Gambar 4.	Alas kandang mencit dari serutan kayu.....	18
Gambar 5.	Botol tempat minum mencit.....	23
Gambar 6.	Fase-fase siklus estrus.....	25
Gambar 7.	Vaginal plug pada mencit.....	30
Gambar 8.	Siklus estrus mencit.....	30
Gambar 9.	Anatomi mencit.....	41
Gambar 10.	Sistem respirasi mencit.....	42
Gambar 11.	Anatomi sistem pencernaan mencit.....	44
Gambar 12.	Organ sistem pencernaan mencit.....	44
Gambar 13.	Saluran pencernaan mencit.....	45
Gambar 14.	Hati dan kantung empedu mencit.....	46
Gambar 15.	Ventrikulus (Lambung) mencit.....	47
Gambar 16.	Sistem urinaria mencit.....	52
Gambar 17.	Kelenjar adrenal dan ginjal mencit.....	52
Gambar 18.	Letak kantung urine mencit.....	53
Gambar 19.	Jantung dan pembuluh darah utama.....	55
Gambar 20.	Jantung mencit.....	55
Gambar 21.	Skeleton mencit.....	57
Gambar 22.	Sistem reproduksi betina.....	58
Gambar 23.	Anatomi organ reproduksi betina.....	58
Gambar 24.	Sistem reproduksi jantan (Skematis).....	60
Gambar 25.	Organ reproduksi jantan.....	61
Gambar 26.	Penandaan mencit sementara.....	66
Gambar 27.	Alat penanda mencit percobaan.....	66
Gambar 28.	Salah satu cara tagging mencit.....	67
Gambar 29.	Cara lain tagging pada mencit.....	67
Gambar 30.	Alternatif lokasi tagging mencit.....	68
Gambar 31.	Microchip transponder tagging mencit.....	69
Gambar 32.	Alat tatto dan tattoo di bagian ekor.....	70
Gambar 33.	Penandaan anak mencit.....	71
Gambar 34.	Teknik memegang mencit.....	72
Gambar 35.	Pengambilan darah di vena lateral ekor.....	75

Gambar 36. Pengambilan darah vena sapena kaki belakang.....	75
Gambar 37. Ukuran jarum suntik dalam Gauge	80
Gambar 38. Bilik hitung thoma.....	89
Gambar 39. Peralatan hidutng darah.	90
Gambar 40. Leukosit granuler dan agranuler	93
Gambar 41. Haemometer Sahli	95
Gambar 42. Mikrohematokrit; Microcentrifuge.....	95
Gambar 43. Teknik inflasi organ paru-paru mencit.....	113
Gambar 44. Testis dan spermatogenesis pada mencit.....	115
Gambar 45. Morfologi normal spermatozoa mencit.....	120
Gambar 46. Jumlah spermatozoa mencit.....	122
Gambar 47. Abnormalitas morfologi spermatozoa mencit.....	127
Gambar 48. Abnormalitas kepala spermatozoa mencit.....	127
Gambar 49. Viabilitas spermatozoa mencit.....	128
Gambar 50. Tipe agglutinasi spermatozoa. A. Head-head; B. Head-tail; C. Mixed tail.	130
Gambar 51. Cryopreservasi dan In Vitro Fertilization.....	134
Gambar 52. Teknik cryopreservasi spermatozoa mencit...	137
Gambar 53. Ovarium dan oogenesis	139
Gambar 54. Vitrifikasi pada mencit.....	143
Gambar 55. Teknik superovulasi pada mencit.....	146
Gambar 56. Perkembangan awal embrio mencit.....	150
Gambar 57. Skema tahapan perkembangan awal embrio mencit.....	151
Gambar 58. Perkembangan lanjut embrio mencit.	153
Gambar 59. DNA mikroinjeksi mencit transgenik.....	166
Gambar 60. Transgenik mencit dengan memanfaatkan retrovirus.....	167
Gambar 61. Teknologi embryonic stem cell.....	168
Gambar 62. Langkah umum pembuatan mencit transgenik dengan metode embryonic stem cell.....	169

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jumlah dan persentase penggunaan berbagai tipe hewan percobaan.	2
Tabel 2. Gambaran representatif dan perbedaan utama antara mencit dan manusia.	3
Tabel 3. Kebutuhan nutrisi mencit	19
Tabel 4. Estimasi kebutuhan diet asam amino mencit	19
Tabel 5. Konsentrasi mineral dalam diet mencit.....	19
Tabel 6. Kebutuhan vitamin dalam diet mencit	20
Tabel 7. Siklus estrus pada mencit	28
Tabel 8. Karakteristik dan komponen urine mencit	53
Tabel 9. Data-data sistem sirkulasi mencit.....	56
Tabel 10. Jumlah maksimum volume (mL) pemberian obat atau simplisia pada hewan uji dan beberapa metode pemberian.....	81
Tabel 11. Perbandingan luas Permukaan Hewan percobaan untuk konversi.....	86
Tabel 12. Bahan anestesi, volume serta lokasi pemberian.	102
Tabel 13. Jenis obat dan metode anestesi.....	104
Tabel 14. Komposisi medium M16 dan HTF.....	160

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas berkat, petunjuk, dan kekuatan dari-NYA, akhirnya penulis dapat menyelesaikan buku mengenal mencit sebagai hewan laboratorium ini. Salah satu hal penting dalam penelitian laboratorium adalah penggunaan hewan uji. Hewan uji seperti mencit merupakan hewan yang populer dalam penelitian laboratorium. Untuk itu perlu diketahui seluk beluk mengenai mencit secara baik, meliputi hal-hal mendasar seperti strain mencit, taksonomi, teknik pemeliharaan, anatomi, teknik penanganan mencit baik dari cara memegang, pemberian obat atau sediaan, termasuk teknik penyuntikan dan pengambilan sampel darah. Teknik membius atau euthanasia pada mencit juga perlu diketahui.

Buku ini ditulis, agar benar-benar dapat bermanfaat dan sekaligus mempermudah dalam praktek penanganan mencit. Buku ini diharapkan bermanfaat bagi mahasiswa, teknisi laboratorium, dosen dan peneliti sebagai pegangan dalam melaksanakan praktikum dan riset, terutama bagi mahasiswa yang sedang mengerjakan tugas akhir di laboratorium dan berhubungan dengan mencit.

Tak lupa, penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu terselesainya buku ini. Terutama kepada Universitas Mulawarman melalui bantuan hibah buku. Buku ini tentu saja jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat dibutuhkan untuk perbaikan ke depan. Akhir kata, selamat membaca dan semoga berguna.

Samarinda, September 2018

Penulis

BAB 1 SEKILAS MENCIT

Pada tahun-tahun terakhir, ratusan ribu hewan digunakan dalam ribuan penelitian di berbagai bidang. Hewan-hewan tersebut meliputi burung, mamalia air dan mamalia darat. Lebih dari 97% mamalia darat menggunakan hewan rodentia (58.35%), termasuk di dalamnya mencit (*Mus musculus*).

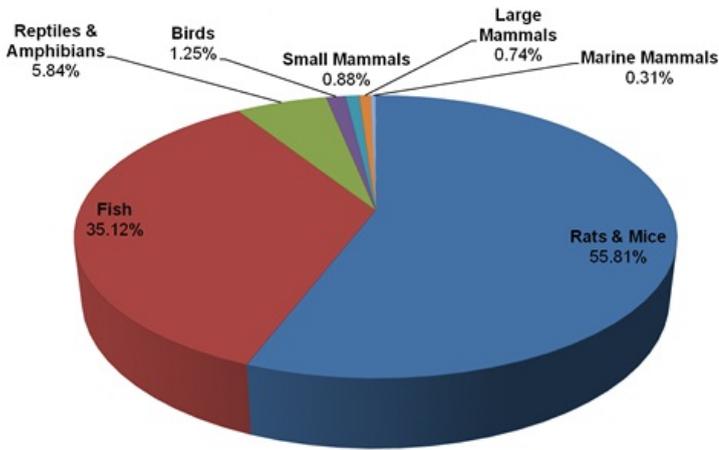
Mencit merupakan hewan yang sering digunakan sebagai hewan laboratorium. Penggunaan mencit sebagai model laboratorium berkisar 40%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena memiliki kelebihan seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip hewan mamalia lain, seperti sapi, kambing, domba, dan babi. Selain itu, mencit dapat hidup mencapai umur 1-3 tahun.

Mencit sering dijumpai dalam riset-riset di laboratorium yang berkaitan dengan bidang fisiologi, farmakologi, biokimia, patologi, histopatologi, toksikologi, embriologi, zoologi komparatif serta bidang biomolekuler. Di bidang kedokteran, mencit dipakai

Tabel 1. Jumlah dan persentase penggunaan berbagai tipe hewan percobaan.

Tipe hewan	Jumlah (Ribuan)	Persentase (%)
Rodentia	126.290	55,81
Ikan	61.792	35,12
Reptil dan Amfibi	23.691	5,84
Burung	1.358	1,25
Mamalia kecil	1.181	0,88
Mamalia besar	1.778	0,74
Mamalia laut	360	0,31
Total	227.362	

Sumber: The University of British Columbia, 2013.



Gambar 1. Penggunaan hewan dalam penelitian

untuk keperluan diagnostik, sedangkan dalam bidang psikologi, hewan tersebut digunakan di laboratorium untuk pengamatan tingkah laku. Mencit sering digunakan sebagai objek penelitian klinis karena struktur anatomi dan fisiologinya yang mempunyai kemiripan dengan struktur anatomi dan fisiologi manusia. Tabel 2 di bawah ini merupakan perbandingan antara mencit dan manusia ditinjau dari beberapa aspek.

Tabel 2. Gambaran representatif dan perbedaan utama antara mencit dan manusia.

Parameter	Mencit	Manusia
Klasis	Mammalia	Mammalia
Ordo	Rodentia	Primata
Family	Muridae	Hominidae
Genus dan Spesies	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
Matang seksual	5-6 minggu	10-15 tahun
Berat badan dewasa (betina)	18-35 gr	75 kg
Berat badan dewasa (Jantan)	20-40 gr	87 kg
Luas permukaan tubuh	0.03-0.06 cm ²	1.6-1.9 m ²
Masa hidup	1-3 tahun	Rata-rata 67 tahun
Masa hidup terpanjang yang pernah dilaporkan	4 tahun	122 tahun
Jumlah keturunan	5-11, tergantung strain	1-2
Tungkai alat berjalan	4	2
Tungkai tangan	0	2
Kuku	ada	ada
Ekor	ada	ada
Rumus vertebrae	C7 T13 L6 S4 Cd28	C7 T12 L5 S5 Cd4
Integument	Haired skin predominates	Glabrous skin predominates
Kelenjar keringat	Eccrine only, restricted to feet	Apocrine and eccrine
Vibrissae	ada	Tidak ada
Kelenjar mammae	10 diffuse, cervical, thoracic, abdominal, inguinal	2 discrete, pectoral
Puting susu jantan	Tidak ada	Ada
Kelenjar lakrimal exorbital	Ada	Tidak ada
Kelenjar Harderian	Ada	Tidak ada
Lobus paru-paru	4 kanan, 1 kiri	3 kanan, 2 kiri
Cerebral giry dan sulci	Tidak ada	Ada
Lobus hati	4: kanan, kiri, median, caudate	4: kanan, kiri, caudate, quadrate
Pankreas	Relatively diffuse in mesentery, indistinct lobation	Well-demarcated, left and right lobes, connected by body
Vesikula seminalis	Ada, very prominent	Ada
Prostat	Ada, 6 lobus	Ada, 4 lobus
Bulbourethralis	Ada	Ada
Kelenjar koagulasi	Ada	Tidak ada
Kelenjar preputial	Ada	Tidak ada
Kelenjar klitoris	Ada	Tidak ada
Uterus	Bicornis	Simplex
Plasenta	Discoidal, labyrinth, hemotrichorial	Discoidal, Villious, hemochorial
Tonsil	Tidak ada	Ada
Hubungan usus-jaringan lymphoid	Ada	Ada
Hubungan Nasal-kelenjar	Ada	Tidak ada

Parameter	Mencit	Manusia
lymphoid		
Hubungan Bronkus-kelenjar lymphoid	Variable	Ada
Kelenjar Zymbal	Ada	Tidak ada, smaller sebaceous glands in external acoustic meatus
Os klitoris	Ada	Tidak ada
Os penis	Ada	Tidak ada
Organ Vomerulonasal	Ada	Kontroversi

Sumber: (Treuting et al. 2012)

Di samping kemiripan anatomi dan fisiologi, mencit merupakan kelompok mamalia yang telah diketahui karakter genetiknya, sehingga tidak heran bahwa mencit cocok digunakan sebagai hewan uji laboratorium untuk penelitian-penelitian yang berkaitan dengan genetik. Di antara hewan-hewan mamalia, mencit adalah hewan yang mempunyai kemiripan genetik dengan manusia. Banyak penelitian yang bergerak di bidang manipulasi genetik, rekayasa gen, selalu menggunakan mencit sebagai bahan percobaan.

Secara genetik, mencit memainkan peranan penting dalam perkembangan ilmu genetika, terutama setelah munculnya hukum Mendel tahun 1900an. Saat ini, nomenklatur genetik mencit sudah diatur dengan jelas di “Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strain” yang dikeluarkan oleh “International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice” (Revisi terakhir Agustus 2014).

Untuk dapat menggunakan mencit sebagai hewan uji di laboratorium baik untuk penelitian yang terkait dengan studi

genetik, pengetahuan obat dan sediaan farmasi, serta penelitian lain yang terkait, perlu sekali untuk mengetahui teknik-teknik pemeliharaan mencit di laboratorium. Pengetahuan mengenai teknik memegang, pemberian pakan dan minum juga menjadi hal yang patut diketahui agar mencit sebagai hewan uji dapat diberlakukan sebagaimana mestinya dan sesuai prosedur penelitian.

Di samping pengetahuan tersebut di atas, mengenal anatomi, fisiologi, reproduksi mencit menjadi hal yang patut untuk dipahami, terlebih jika penelitian yang sedang dilakukan terkait dengan aspek-aspek tersebut. Teknik pemberian sediaan atau simplisia, teknik pengambilan dan perhitungan darah mencit menjadi hal yang menarik untuk dipelajari agar dalam analisis data yang terkait dengan variabel-variabel tersebut dapat dilakukan dengan baik dan benar.

Apabila pada akhir penelitian mencit akan dikorbankan, maka pengetahuan mengenai anestesi hingga teknik membedah mencit mutlak diperlukan agar teknik anestesi maupun cara membedah tidak mengacaukan data penelitian yang akan diambil. Teknik anestesi yang keliru dan cara membedah mencit secara asal, tentu saja dapat mengakibatkan kerusakan pada organ maupun jaringan tertentu dan hal tersebut berdampak tidak sahnya data penelitian.

Dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan, terutama adanya terobosan-terobosan bioteknologi, mencit yang digunakan dapat dimanipulasi. Muncullah adanya mencit

transgenik yang pada saat ini banyak sekali macamnya dan dapat digunakan sesuai dengan tujuan penelitian.

Pada akhirnya, penggunaan mencit sebagai hewan uji juga harus memenuhi standar etika hewan (Animal ethics). Penggunaan mencit sebagai hewan uji di laboratorium mulai dari pemeliharaan mencit hingga dikorbankan tidak menyebabkan penderitaan terhadap hewan uji.

BAB 2 STRAIN MENCIT

Strain laboratorium mencit yang digunakan hingga saat ini merupakan keturunan dari *Mus domesticus*, “European house mouse” dengan beberapa gen dari spesies Asia.

Dalam percobaan-percobaan di laboratorium ada beberapa strain mencit yang digunakan, diantaranya adalah:

1. Swiss Webster

Mencit strain Swiss Webster merupakan galur mencit yang umum dipakai untuk berbagai jenis penelitian. Mencit betina strain Swiss Webster ini juga sering digunakan dalam percobaan embrio transfer di laboratorium transgenik dan testing berbagai obat-obatan. Umumnya mencit strain ini berwarna putih (albino).

2. A/Jak

Strain ini dapat dihasilkan di laboratorium dengan cara mengawinkan hingga beberapa generasi, misal 30 generasi. Kelemahan dari strain ini jika digunakan untuk penelitian tumor adalah, frekuensi tumor kelenjar susu yang rendah.

3. Balb /C7

Mencit strain BALB/c pada umumnya digunakan untuk produksi plasmacytomas setelah injeksi dengan minyak mineral untuk produksi antibiodi monoklonal. Meskipun tidak semua strain BALB/c telah dipelajari untuk induksi plasmacytoma. Ciri lain strain ini adalah: Mammary tumor rendah namun infeksi tumor kelenjar susu dengan pemajanan MMTV⁺ C3H jumlah tumor meningkat tajam. BALB/c juga

dikembangkan untuk penelitian kanker paru-paru, retikular neoplasma, renal tumor.

4. Bab b/c

Strain ini meskipun mempunyai frekuensi tumor kelenjar susu yang rendah namun sangat *susceptible* terhadap *Mamary Tumor Virus* (MTV).

5. C3H

Strain ini mempunyai frekuensi tumor mamma tinggi karena mengandung *Mamary Tumor Virus*, degenerasi retina, densitas tulang padat, Glukosa toleran, resistan terhadap trypanosoma dan resistan terhadap aterosklerosis.

6. GRS/Ajs (GR)

Mencit strain GRS/Ajs (GR) merupakan strain yang terbaik untuk mempelajari berbagai jenis tumor kelenjar susu. Mencit ini pernah dikembangkan di bagian Patologi Anatomik FK UI. Mencit strain ini diperoleh dari Department of Biology, The Netherlands Cancer Institute, Anthoni van Leeuwenhoekhuis, Amsterdam. Karakter mencit strain ini adalah membawa virus tumor kelenjar susu yang berbeda dari strain lainnya, yaitu tidak hanya ditularkan melalui air susu, tetapi juga melalui sperma serta ovum. Tumor mammae dijumpai sangat dini pada mencit strain GR betina yang dibiakkan. Ciri lain strain ini adalah timbulnya tumor kelenjar susu karena pengaruh hormon.

7. A/J

Strain ini dikembangkan oleh LC Strong pada tahun 1921 dari persilangan Cold spring harbour albino x Bagg albino. Strain ini sering digunakan dalam penelitian kanker dan imunologi. Strain ini sangat rentan terhadap kelainan celah langit-langit bawaan yang disebabkan induksi Kortison. Memiliki tingkat insiden yang tinggi adenoma paru spontan, dan tumor paru-paru mudah berkembang dalam menanggapi karsinogen. Persentase tinggi dari adenokarsinoma mammae (sebagian besar jenis asinar). Strain A/J yang diberi diet aterogenik (1,25% kolesterol, 0,5% asam kolat, dan 15% lemak) gagal untuk mengembangkan lesi aterosklerotik aorta.

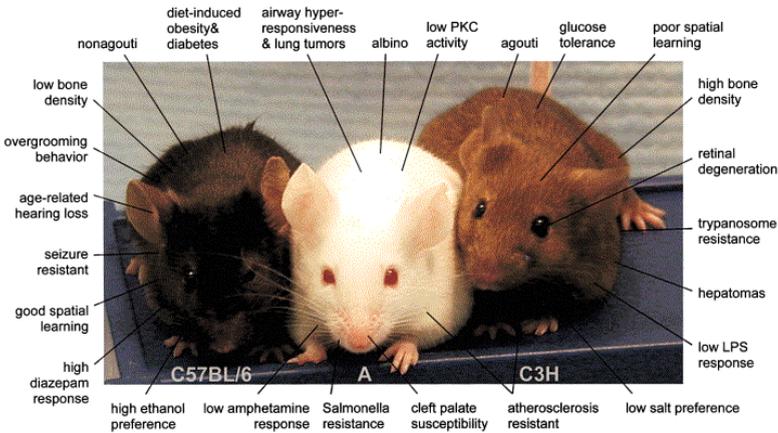
8. C57BL/6

Strain mencit ini juga dikenal dengan strain C57 atau Black 6, merupakan mencit inbreed yang sering digunakan untuk penelitian bidang genetik. Warna mencit ini coklat gelap mendekati hitam. Sensitif terhadap suara dan bau. Lebih suka menggigit. mencit strain ini sering digunakan untuk percobaan transgenik

Selain strain-strain di atas masih banyak lagi strain-strain dari mencit seperti: 129S1/SvImJ; CBA/CaHN-*Btk^{xid}*/J; NU/J; SJL/J dan AKR/J

Pada dasarnya mencit laboratorium merupakan hewan yang masih sekerabat dengan mencit liar atau mencit rumahan. Semua galur mencit laboratorium yang ada sekarang

merupakan keturunan dari mencit liar. Mencit laboratorium mempunyai berat badan yang relatif sama dengan mencit liar.



Gambar 2. Contoh karakteristik strain mencit
 Sumber: Hamilton, B.A. and W.N. Frankel. 2001.

Mencit dapat digunakan sebagai organisme model dalam penelitian-penelitian yang berkaitan dengan gen manusia dan penyakit-penyakit pada manusia. Penggunaan mencit untuk penelitian penyakit manusia terutama penyakit kanker *Acute promyelocytic leukemia* (APL) membuahkan hasil yang gemilang. Namun sayangnya hasil-hasil penelitian dengan mencit tidak selalu akurat sebagai model preklinik efek obat-obatan. Banyak obat-obatan yang bekerja baik ketika diterapkan pada hewan mencit, namun sayangnya uji klinik lanjutan pada manusia menjadi tidak efektif.

Penelitian-penelitian yang berorientasi pada mutasi dan transgenik juga telah banyak memanfaatkan berbagai strain mencit. Hasil penelitian tersebut dapat memberikan gambaran pemahaman berbagai jenis penyakit yang terjadi pada manusia.

Pada umumnya DNA sel germinativum mencit dapat direkayasa dengan berbagai cara. Teknik rekayasa pada mencit untuk membuat mencit transgenik dapat dilakukan dengan cara menyuntikkan (Microinjection) sekuens DNA ke dalam pronukleus jantan pada ovum mencit yang telah difertilisasi. DNA yang telah diinjeksikan kemudian dapat terintegrasi ke dalam DNA kromosomal mencit.

BAB 3 KEDUDUKAN TAKSONOMI

Mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan, yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya. Mencit memiliki bulu pendek halus berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari pada badan dan kepala. Ciri-ciri lain mencit secara umum adalah tekstur rambut lembut dan halus, bentuk hidung kerucut terpotong, bentuk badan silindris agak membesar ke belakang warna rambut putih, mata merah, ekor merah muda.

Mencit merupakan hewan yang termasuk dalam famili Muridae. Mencit liar atau mencit rumah adalah hewan satu spesies dengan mencit laboratorium. Semua galur mencit laboratorium sekarang ini merupakan keturunan dari mencit liar sesudah melalui peternakan selektif. Mencit memiliki taksonomi sebagai berikut:

Klasifikasi Mencit

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Sub filum : Vertebrata
Class : Mamalia
Sub class : Theria
Ordo : Rodentia
Sub ordo : Myomorpha
Famili : Muridae
Sub family : Murinae

Genus : Mus
Species : *Mus musculus*

Dari klasifikasi mencit di atas dapat diuraikan beberapa ciri pokok dari mencit:

Mencit termasuk dalam filum chordate yang artinya mempunyai chorda dorsalis, batang syaraf dorsal tunggal dan mempunyai celah insang pada masa embrionya dan tidak berfungsi sebagai alat pernapasan. Mencit dikelompokkan dalam kelas mamalia. Seperti telah diketahui, mamalia adalah kelompok hewan vertebrata yang menduduki tempat tertinggi dalam perkembangan hewan. Nama mamalia merujuk pada ciri utama anggota mamalia yaitu adanya kelenjar mammae atau kelenjar air susu yang dapat menghasilkan air susu (pada betina) yang dapat diberikan ke keturunannya.

Selain adanya kelenjar mammae, semua jenis mamalia mempunyai rambut, namun berbeda dalam hal distribusi, ukuran, fungsi, modifikasi dan kekebalannya. Selain ciri tersebut mencit juga termasuk hewan yang mempunyai adaptasi homeoterm yaitu mempunyai kemampuan mempertahankan suhu tubuh.

Ciri lain mencit sebagai kelompok mamalia dan subkelas theria adalah, mempunyai daun telinga (pinna), tengkorak bersendi pada tulang atlas melalui dua *condyles occipitalis*, gigi-gigi dijumpai ada hewan muda serta tua, eritrosit tidak bernukleus, otak dengan 4 *lobus opticus* jumlah jari pada tiap

kaki tidak lebih dari 5, ginjal tipe metanephros dan bersifat vivipar.

Sebagai anggota ordo rodentia, mencit mempunyai ciri-ciri: jari-jari lima masing-masing bercakar, gigi seri pada rahang atas hanya sepasang membentuk seperti pahat dan tumbuh terus, tanpa taring, testes abdominal, plasenta tipe *discoidal*.

BAB 4 PEMELIHARAAN MENCIT

Mencit dikategorikan dalam hewan *crepuscular*, yaitu hewan yang aktif saat senja dan malam hari. Daur hidup mencit berkisar satu hingga dua tahun bahkan ada yang lebih dan mencapai tiga tahun. Mencit dapat dikawinkan setelah usia dewasa yaitu sekitar delapan minggu. Lama kebuntingan mencit dari 19-21 hari dengan jumlah anak hingga 6 ekor. Berat mencit jantan dewasa sekitar 20-40 gram dan betina dewasa 18-35 gram.

Berikut ini dijelaskan beberapa aspek penting dalam pemeliharaan mencit sebagai hewan uji di laboratorium. Beberapa hal penting, mulai dari tempat pemeliharaan, pakan, minum dan perawatan selama menjadi hewan uji dijabarkan secara rinci di bawah ini.

A. Kandang Mencit

Kandang mencit di laboratorium dapat berupa kotak dengan ukuran panjang 40 cm x lebar 30 cm x tinggi 18 cm untuk kepadatan 5-7 ekor mencit. Rasio jantan dan betina yaitu: 1 ekor jantan dengan 4 ekor betina. Bahan kandang berupa plastik, aluminium atau baja tahan karat, serta dapat juga dari bahan kaca seperti akuarium. Prinsip umumnya adalah kandang harus mudah dibersihkan, disterilkan, tahan lama, tidak mudah dikerat oleh mencit. Bahan dari Polivinil klorida (PVC) tidak disarankan karena mudah dikerat oleh mencit dan susah disterilkan karena tidak tahan panas.

Dasar kandang sebaiknya diberi materi yang dapat menyerap air, dan tidak mengandung senyawa berbahaya atau yang mengganggu penelitian. Alas kandang harus diganti secara rutin dan sesegera mungkin jika sudah basah. Jika dibiarkan maka akan menimbulkan bibit penyakit. Salah satu indikator alas kandang harus diganti adalah, terciumnya bau ammoniak. Jumlah mencit dalam kandang juga mempengaruhi frekuensi pergantian alas kandang, makin banyak mencit dalam satu kandang, makin sering alas kandang harus diganti. Setidak-tidaknya jika alas kandang diganti seminggu sekali, terutama pada musim dingin atau penghujan, udara dingin, alas kandang akan cepat basah dan lembab sehingga frekuensi pengantiannya lebih sering dalam satu minggu.



Gambar 3. Model kandang mencit dari boks plastik

Bahan yang cocok digunakan sebagai alas kandang seperti sobekan kertas, serutan kayu, sisa gergajian kayu, sekam padi, atau zeolit aktif. Masing-masing bahan tersebut mempunyai

keuntungan dan kerugian bila digunakan sebagai alas kandang pemeliharaan mencit.

1. Sobekan kertas

Murah, mudah, namun mudah kotor, mampu menyerap air. Frekuensi penggantian harus sering

2. Serutan kayu/sisa gergajian

Murah dan mudah diperoleh. mudah lembab, harus sering diganti. Gunakan serutan atau sisa gergajian yang halus dan kecil-kecil. Perlu diperhatikan jangan ada serutan yang kasar, karena akan melukai mencit. Sebelum digunakan harus dikeringkan terlebih dahulu.

3. Sekam padi

Relatif murah dan mudah didapat. Kurang menyerap air dan bau. Pergantian harus sering. Sebelum digunakan sebagai alas kandang harus dikeringkan terlebih dahulu

4. Zeolit aktif

Harga relatif mahal dan kadang susah dicari. Mampu menyerap air dan bau dengan baik sehingga kandang lebih sehat dan segar. Setelah pemakaian beberapa lama dapat dicuci jika kotor dan digunakan kembali setelah diaktivasi. Ukuran zeolit aktif yang digunakan adalah 2-3 mm berupa butiran kerikil halus. Penggunaan zeolit aktif dapat dikombinasikan dengan serabut atau seresah kelapa sebagai tempat bersembunyi atau sarang.



Gambar 4. Alas kandang mencit dari serutan kayu

Penempatan kandang mencit sebaiknya diletakkan di ruangan yang bersih, terlindung dari angin, hujan dan cahaya matahari langsung serta memperoleh sirkulasi udara yang memadai. Suhu yang cocok untuk pemeliharaan mencit sekitar 20-25°C dengan kelembaban 45-55%.

B. Pakan

Pakan untuk mencit pada dasarnya dibuat dengan memperhatikan zat-zat gizi yang terkandung di dalamnya seperti mengandung komponen karbohidrat, protein, lemak, mineral serta nutrien gizi lainnya seperti vitamin. Besaran nilai gizi tersebut dapat bervariasi sesuai umur maupun jenis kelamin, namun sebagai acuan komposisi berikut ini dapat digunakan: protein, 20-25%; lemak, 10-12%; pati, 45-55%; serat kasar, 4% atau kurang; dan abu, 5-6%. Pakan mencit

harus juga mengandung vitamin A (15.000-20.000 IU/kg); vitamin D (5000 IU/kg); alfa tokoferol (50 mg/kg); asam linoleat (5-10 g/kg); timin (15-20 mg/kg); riboflavin (8 mg/kg); pantotenat (20 mg/kg); vitamin B12 (30 UG/kg); biotin (80-200 UG/kg); piridoksin (5 mg/kg); intisol (10-1000 mg/kg); dan kolin (20 h/kg). Di samping faktor nilai gizi, pakan mencit yang dibuat harus mudah dicerna, enak dan mencit mau mengkonsumsinya.

Tabel 3. Kebutuhan nutrisi mencit

Nutrien	Konsentrasi di dalam diet (%)
Protein kasar	20-25
Lemak	5-12
Serat	2-5
Karbohidrat	45-60

Sumber: (Jacoby & Fox 1984)

Tabel 4. Estimasi kebutuhan diet asam amino mencit

Asam amino	Diet murni/purified-diet (%)
Arginin	-
Histidin	-
Tirosin	0.12
Isoleusin	0.2
Leusin	0.25
Lisin	0.15
Metionin	0.3
Fenilalanin	0.25
Treonin	0.22
Triptopan	0.05
Valin	0.3

Sumber: (Jacoby & Fox 1984)

Tabel 5. Konsentrasi mineral dalam diet mencit

Mineral	Diet murni
Kalsium (%)	0.52
Klorida (%)	0.16
Magnesium (%)	0.05

Mineral	Diet murni
Fosfor (%)	0.4
Potasium (%)	0.36
Sodium (%)	0.1
Sulfur (%)	-
Kromium (mg/kg)	2.0
Kobalt (mg/kg)	-
Cooper (mg/kg)	6.0
Fluoride (mg/kg)	-
Iodine (mg/kg)	0.2
Besi/Fe (mg/kg)	35.0
Mangan (mg/kg)	54.0
Molibdenum (mg/kg)	-
Selenium (mg/kg)	0.1
Vanadium (mg/kg)	-
Zinc (mg/kg)	30.0

Sumber: (Jacoby & Fox 1984)

Tabel 6. Kebutuhan vitamin dalam diet mencit

Vitamin	Diet murni
A (IU/kg)	4000
D (IU/kg)	1000
E (IU/kg)	50
K ₁ ekuivalen (mg/kg)	0.05
Biotin (mg/kg)	0.2
Kolin (mg/kg)	1000
Folacin (mg/kg)	2
Inositol (mg/kg)	-
Niacin (mg/kg)	30
Kalsium pantotenate (mg/kg)	16
Riboflavin (mg/kg)	6
Tiamin (mg/kg)	6
Vitamin B ₆ (mg/kg)	7
Vitamin B ₁₂ (mg/kg)	0.01

Sumber: (Jacoby & Fox 1984)

Kebutuhan pakan seekor mencit kurang lebih sebanyak 10% (pakan kering) dari bobot tubuhnya perhari. Seekor mencit dewasa dapat memakan 3-5 gr per hari. Mencit yang sedang bunting atau menyusui, lebih banyak memerlukan pakan. Sementara itu, kebutuhan minum seekor mencit kira-kira 15 – 30 mL air per hari.

Pertimbangan lain pemberian pakan mencit adalah: dilihat dari pertumbuhan berat normal mencit. Pertumbuhan berat badan mencit normal yaitu 1 gr/ekor/hari. Hal tersebut berkaitan dengan konsumsi pakan yaitu 10 gr/ekor/hari akan meningkatkan pertumbuhan berat badan tiap harinya sebesar 1 gr/ekor/hari. Berat mencit jantan umur 4 minggu mencapai 18-20 gr, jantan dewasa kira-kira 20-40 gr, sedangkan pada betina 18-35 gr.

Jika pemberian makan mencit banyak mengandung makanan berlemak, mencit dapat mengalami kegemukan atau obesitas. Mencit dikatakan telah mengalami obesitas dapat diketahui menggunakan indeks obesitas Lee. Jika nilai indeks obesitas Lee > 0.3 maka mencit dapat dikatakan obesitas. Indeks obesitas Lee dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks Obesitas Lee} = \frac{\text{Panjang nasoanal (mm)}^2}{\text{Berat (gr)}} \times 100$$

Panjang nasoanal merupakan panjang dari ujung ekor sampai ujung hidung pada posisi tubuh terlentang lurus, diukur dalam mm dengan menggunakan penggaris atau pita.

C. Tempat Pakan dan Minum

Tempat makan mencit biasanya hanya berupa baskom atau wadah kecil dengan ukuran bebas dan disesuaikan dengan kebutuhan dan ukuran kandang serta populasi dalam kandang. Bahan tempat pakan tentu saja terbuat dari bahan yang tidak

mudah dikerat oleh mencit. Baskom atau wadah ini dapat diisi pakan sesuai dengan kebutuhan.

Tempat minum mencit dapat menggunakan tempat minum hamster yang dapat dibeli toko hobi hamster atau *pet shop*. Harganya relatif mahal, namun cukup baik digunakan sebagai tempat minum mencit. Alternatif lain adalah membuat sendiri tempat minum mencit. Bahan-bahan dan teknis pembuatannya sebagai berikut.

1. Siapkan botol bekas berbahan dari kaca (botol bekas minuman suplemen misalnya), pipa kecil dengan diameter kurang lebih 5 mm, lem, bor kecil atau paku besar
2. Pertama-tama buatlah lubang pada tutup botol sesuai dengan diameter pipa
3. Potong pipa kecil dengan ukuran lebih kurang 5 cm atau disesuaikan dengan tinggi kandang agar mencit dapat dengan mudah menjangkau ujung pipa
4. Masukkan pipa yang telah dipotong ke dalam lubang yang telah dibuat di tutup botol
5. Berikan lem agar tidak bocor pada sambungan pipa dengan tutup botol tersebut. Sedapat mungkin bagian ini jangan sampai bocor. karena jika bocor akan menyebabkan basah pada alas kandang dan mudah menimbulkan bibit penyakit serta mencit jadi tidak sehat
6. Tempat minum siap diuji coba. Masukkan air matang kurang lebih $\frac{3}{4}$ isi botol, tutup botol

7. Balikkan botol tersebut. Pembuatan berhasil jika tidak ada tetesan dari botol tersebut. Air hanya menetes jika dijilat oleh mencit.



Gambar 5. Botol tempat minum mencit

D. Mengawinkan Mencit

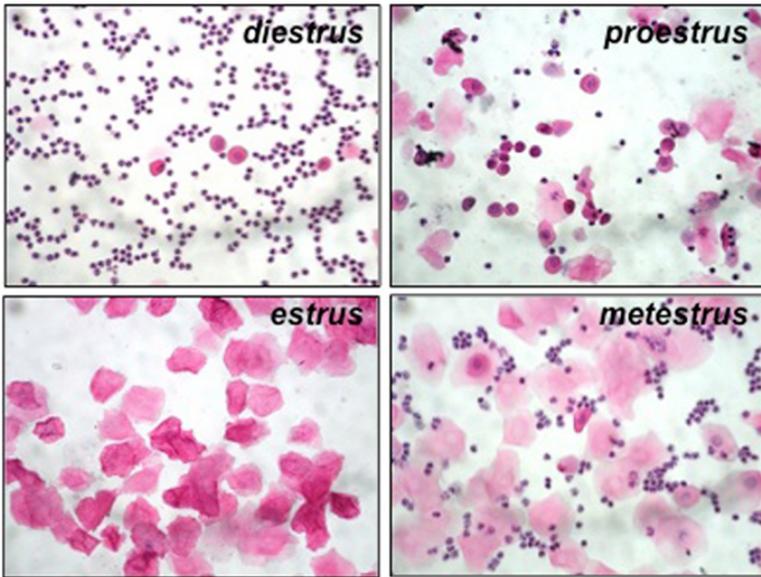
Mengawinkan mencit biasanya digunakan untuk keperluan perbanyakan atau kepentingan penelitian yang berhubungan dengan embriologi atau teratologi. Indukan yang baik untuk dikawinkan harus yang baik dan sehat, karena akan menghasilkan anakan atau keturunan yang baik dan sehat pula.

Periode aktivitas reproduksi pada mencit berlangsung sejak umur dewasa seksual hingga umur 14 bulan dan lebih lama lagi pada mencit jantan. Mencit betina hanya akan berkopulasi dengan mencit jantan selama masa estrus, yaitu ketika sel telur atau ovum siap dibuahi. Waktu kopulasi dapat terjadi antara 5 jam sebelum ovulasi hingga 8 jam setelah ovulasi.

Fase estrus mencit dapat ditentukan dengan melihat ciri organa genitalia eksternanya, yaitu vulva yang membengkak dan berwarna kemerahan. Fase estrus juga dapat diketahui dengan pembuatan apusan vagina. Berikut ini cara pembuatan apusan vagina dan pengamatan hasilnya.

1. Basahi cotton bud dengan NaCl 0,9%
2. Usapkan cotton bud pada vagina mencit
3. Oleskan cotton bud pada gelas obyektif
4. Teteskan Metylen blue 1% dan dibiarkan kering (3-5 menit)
5. Kelebihan metylen blue dibuang (diusap dengan tissue atau disiram air)
6. Dibiarkan hingga kering
7. Amati apusan vagina dengan bantuan mikroskop
8. Penentuan tahap siklus reproduksi melalui gambar apusan vagina

Keberadaan sel-sel epitel menanduk pada apusan vagina menunjukkan mencit berada pada fase estrus. Fase estrus mencit pada umumnya dimulai pada tengah malam. Kopulasi alami terjadi sekitar pukul 02.00 menjelang pagi. Sperma yang diejakulasikan ke dalam vagina pada waktu kopulasi akan mencapai oviduk hanya dalam beberapa menit. Mobilitas dan viabilitas sperma dipertahankan selama 8 jam setelah ovulasi.



Gambar 6. Fase-fase siklus estrus
 Sumber: Zenclussen et al 2014.

1. Fase Diestrus

Fase diestrus terjadi selama 2-2,5 hari. Pada tahap diestrus akan terbentuk folikel-folikel primer yang belum tumbuh dan beberapa yang mengalami pertumbuhan awal. Hormon estrogen masih sedikit yang diproduksi ovarium. Diestrus disebut pula fase istirahat karena mencit betina sama sekali tidak menunjukkan ketertarikan pada mencit jantan.

Apusan vagina terlihat dominansi sel epitel berinti dan sel leukosit. Uterus mencit terdapat banyak mukus, kelenjar menciut dan tidak aktif, ukuran uterus kecil, dan terdapat banyak lendir.

2. Fase Proestrus

Proestrus merupakan fase persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang menyebabkan folikel tumbuh dengan cepat menjadi folikel de Graaf. Pada fase ini hormon estrogen kadarnya meningkat dan *Luteinizing hormone* (LH) siap terbentuk. Peningkatan jumlah estrogen menyebabkan pemasokan darah ke sistem reproduksi untuk meningkatkan pembengkakan sistem dalam. Kelenjar cervix dan vagina dirangsang untuk meningkatkan aktifitas sekretori membangun muatan vagina yang tebal. Karakteristik sel pada saat proestrus yaitu bentuk sel epitel bulat dan berinti, leukosit tidak ada atau sedikit.

Proestrus berlangsung selama 2-3 hari. Kandungan air di uterus meningkat dan mengandung banyak pembuluh darah serta kelenjar-kelenjar endometrial mengalami hipertrofi. Apusan vaginanya akan nampak sel-sel epitel yang sudah tidak berinti (sel kornifikasi) dan tidak ada lagi leukosit. Sel kornifikasi ini terbentuk akibat adanya pembelahan sel epitel berinti secara mitosis dengan sangat cepat sehingga inti pada sel yang baru belum terbentuk sempurna bahkan belum terbentuk inti dan sel-sel baru ini berada di atas sel epitel yang membelah, sel-sel baru itulah disebut sel kornifikasi (sel yang menanduk).

Perilaku mencit betina pada fase ini sudah mulai gelisah namun keinginan untuk kopulasi belum terlalu besar. Fase ini

akan terjadi selama 12 jam. Fase Proestrus akan berlanjut dengan fase estrus.

3. Fase Estrus

Fase estrus berarti “kegilaan” atau “gairah”. Pada fase ini hipotalamus terstimulasi untuk melepaskan *Gonadotropin-releasing hormone* (GRH). Hormon estrogen menyebabkan pola perilaku kawin pada mencit, gonadotropin akan menstimulasi pertumbuhan folikel yang dipengaruhi FSH sehingga menyebabkan ovulasi. Kadar FSH ini lebih rendah dibandingkan dengan kadar LH. Jika terjadi coitus, mencit akan mengalami kehamilan.

Saat dalam fase estrus biasanya mencit terlihat tidak tenang dan lebih aktif, dengan kata lain mencit berada dalam keadaan mencari perhatian kepada mencit jantan dan reseptif terhadap pejantan. Mencit jantan mampu melakukan semacam panggilan ultrasonik dengan jarak gelombang suara 30 kHz - 110kHz yang dilakukan sesering mungkin selama masa pendekatan dengan mencit betina.

Di sisi lain, mencit betina menghasilkan semacam feromon yang dihasilkan oleh kelenjar preputial yang diekskresikan melalui urin. Fungsi feromon untuk menarik perhatian mencit jantan. Mencit dapat mendeteksi feromon ini karena terdapat organ vomeronasal yang terdapat pada bagian dasar hidungnya.

Pada fase estrus, vagina mencit membengkak dan berwarna kemerahan. Tahap estrus mencit terjadi dua tahap

yaitu tahap estrus awal dengan ciri folikel sudah matang, sel-sel epitel sudah tidak berinti, dan ukuran uterus pada tahap ini adalah ukuran uterus maksimal, tahap ini terjadi selama 12 jam. Tahap kedua adalah tahap estrus akhir dengan ciri: terjadi ovulasi yang hanya berlangsung selama 18 jam.

4. Fase Metestrus

Pada fase metestrus, birahi mencit mulai menurun dan berhenti, aktivitasnya mulai tenang. Mencit betina sudah tidak reseptif pada jantan. Ukuran uterus pada tahap ini adalah ukuran yang paling kecil karena uterus menciut. Pada ovarium, korpus luteum dibentuk secara aktif. Fase ini terjadi selama 6 jam. Pada tahap ini hormon yang dominan adalah hormon progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Sebagai rangkuman siklus estrus dapat dilihat pada tabel 7 di bawah ini:

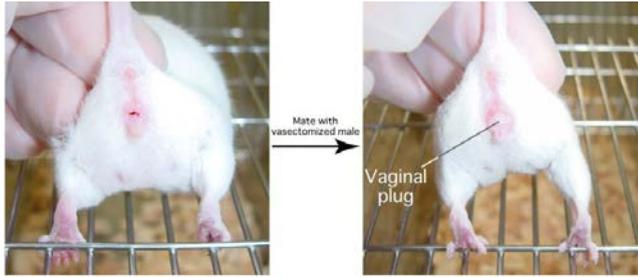
Tabel 7. Siklus estrus pada mencit

Fase	Kondisi ovarium	Kondisi uterus	Apusan vagina
Diestrus 48-60 jam	Folikel muda	Tipis	Epitel berinti sedikit, leukosit banyak, dijumpai lendir atau mukus
Proestrus 12 jam	Folikel tumbuh	Menebal	Epitel bentuk bulat dan berinti, Epitel kornifikasi ada, leukosit tidak ada atau sedikit
Estrus Awal 12 jam Akhir 18 jam	Ovulasi Ovulasi	Glandular Glandular	Epitel kornifikasi banyak, sel epitel dengan inti berdegenerasi
Metestrus	Korpus luteum	Luruh	Epitel menanduk

Fase	Kondisi ovarium	Kondisi uterus	Apusan vagina
6 jam	(akan menciut)		sedikit, Leukosit banyak

Mencit betina dikawinkan dengan mencit jantan secara alami dengan cara menyatukan mencit betina dan mencit jantan dalam satu kandang dengan perbandingan 1 betina 1 jantan. Setelah 24 jam dari saat dikawinkan, diamati adanya sumbat vagina (*copulatory plug*), yaitu sumbat kekuningan pada vagina yang merupakan campuran sekret vesikula seminalis betina dengan ejakulat jantan yang mengeras. Sumbat vagina ini mengisi bagian vagina mulai dari cervic hingga vulva. Deteksi sumbat vagina pada umumnya kadang-kadang dikombinasikan dengan pengamatan sitologi vagina untuk evaluasi fertilitas dan konsepsi. Adanya sumbat pada vagina tersebut dihitung sebagai kebuntingan hari ke nol.

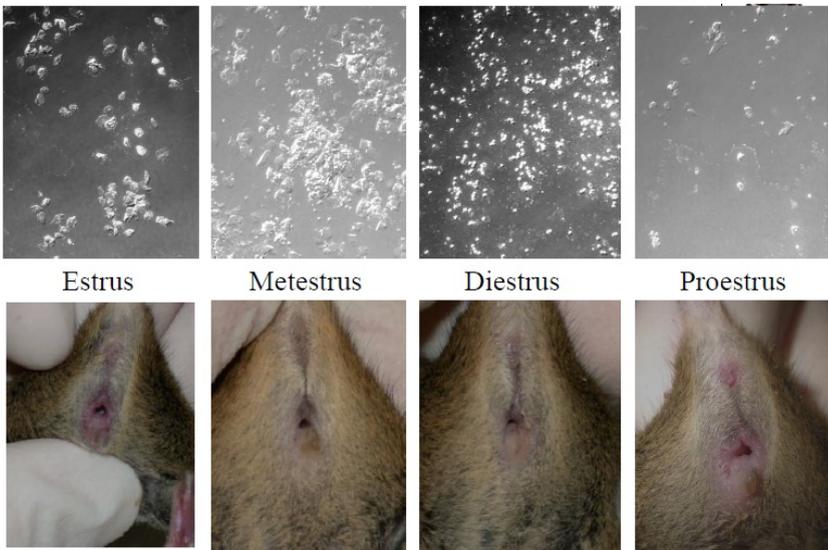
Mencit yang telah dewasa dan siap dikawinkan mempunyai bobot jantan 28 gram, betina 20-25 gram. Kebuntingan antara 17-22 hari, rata-rata 21 hari Mencit termasuk hewan polioestrus, siklusnya berlangsung setiap 4-5 hari sekali, lamanya birahi antara 9-20 jam,



Vagina dalam masa Proestrus

Vagina dengan *copulatory plug*

Gambar 7. Vaginal plug pada mencit



Estrus

Metestrus

Diestrus

Proestrus

Gambar 8. Siklus estrus mencit
Sumber: (Conour 2014).

estrus terjadi 20-40 jam setelah partus. Penyapihan dapat menginduksi estrus dalam 2-4 hari. Cara perkawinan mencit berdasarkan rasio jantan dan betina dibedakan atas monogamus, triogamus dan harem. Sistem Monogamus terdiri dari satu jantan dan satu betina, triogamus terdiri dari satu jantan dan dua betina dan harem satu jantan lebih dari tiga betina dalam satu kandang.

Berikut ini rangkuman data-data yang dapat digunakan, sehubungan dengan reproduksi mencit:

- € Mencit siap dikawinkan pada umur 8 minggu
- € lama bunting 19-21 hari
- € kawin sesudah beranak 1-24 jam
- € umur disapih 21 hari
- € tipe siklus estrus=poliestrus
- € lama estrus 4-5 hari
- € perkawinan berlangsung selam 12-14 jam
- € ovulasi terjadi pada saat estrus
- € Fertilisasi terjadi dekat akhir periode estrus dan terjadi spontan
- € segmentasi ovum menjadi blastocoel 2.5-4 hari
- € implantasi terjadi 4-5 hari setelah fertilisasi

Ketika cervic dan vagina secara fisik distimulasi selama masa estrus, prolaktin dibebaskan dari anterior hipofisis untuk memungkinkan sekresi progesteron oleh korpus luteum. sekresi progesteron ini akan terus berlanjut sekitar 13 hari lamanya.

Jika fertilisasi terjadi, plasenta akan mengambil alih produksi progesteron. Namun jika tidak terjadi fertilisasi, terbentuk periode kehamilan semu akan terjadi. Kehamilan semu terjadi selama fase estrus dan ovulasi.

Fertilisasi mencit pada umumnya terjadi di ampulla atau bagian awal dari oviduct. Ovum dapat difertilisasi untuk menghasilkan embrio normal dan waktu pembentukan embrio sekitar 10-12 jam pasca ovulasi. Kelahiran anak mencit pada umumnya terjadi dini hari sekitar pukul 4 pagi pada mencit yang dipelihara dengan siklus fotoperiode alamiah, namun tidak menutup kemungkinan kelahiran anak-anak mencit terjadi pada siang hari.

E. Gestasi mencit

Masa gestasi atau masa kehamilan mencit umumnya sekitar 19-21 hari. Masa gestasi tersebut dapat terjadi secara simultan dengan masa postpartum estrus dan laktasi. Laktasi dapat menghambat gestasi dikarenakan adanya penundaan implantasi. Hal tersebut dapat menyebabkan pemanjangan masa gestasi hingga 12-13 hari pada strain inbred tertentu. Strain yang berbeda memiliki rata-rata perbedaan masa gestasi. Dalam satu strain bahkan satu mencit betina dapat terjadi perbedaan yang signifikan periode gestasi satu ke periode berikutnya.

Banyak faktor yang mempengaruhi panjangnya masa gestasi. Sebagai contoh, keturunan mencit yang berukuran

lebih besar akan cenderung lahir lebih awal, seperti juga terjadi pada manusia. Selain itu, non inbred mencit betina juga cenderung mempunyai waktu gestasi yang lebih pendek daripada inbred.

Masa gestasi dapat memanjang saat periode laktasi keturunan sebelumnya. Perpanjangan masa gestasi dapat berlangsung hingga 7 hari dan kelahiran dapat terjadi kembali hingga 16 hari kemudian.

F. Jumlah anak mencit sekelahiran

Jumlah anakan mencit dalam satu kelahiran merupakan jumlah total anak hidup dan mati pada waktu satu periode kelahiran. Jumlah anak mencit mencapai 6 hingga 15 ekor dalam satu kali melahirkan. Besarnya jumlah anak dalam satu kali lahir dipengaruhi oleh bangsa ternak, umur induk, musim kelahiran, makanan, silang dalam dan kondisi lingkungan.

Faktor yang mempengaruhi jumlah mencit satu kali lahir adalah:

1. Kualitas dan kuantitas pakan yang diberikan pada induk
2. Musim kawin
3. Jumlah sel telur yang dihasilkan
4. Tingkat kematian embrio

Kekurangan pakan baik secara kuantitas maupun kualitas yang diberikan kepada Indukan dapat berakibat kepada kematian embrio, kelahiran cacat hingga kematian. Kualitas dan kuantitas spermatozoa pada induk jantan akan terjadi

apabila faktor pakan tidak terpenuhi, sedangkan, jumlah sel telur yang dihasilkan dan tingkat awal kematian embrio mempunyai hubungan yang signifikan dengan jumlah anak mencit dalam satu kelahiran. Sementara itu, jumlah anak mencit yang disapih adalah jumlah anak mencit hidup hingga umur disapih. Jumlah anak mencit yang disapih dipengaruhi faktor-faktor:

1. Umur induk
2. Pemberian pakan
3. Kondisi induk pada waktu dikawinkan
4. Sistem perkawinan monogami atau poligami
5. Kematian dalam kandang ternak

Sistem perkawinan monogami dan poligami pada mencit mempunyai pengaruh nyata terhadap jumlah anak waktu sapih. Sistem monogami adalah seekor jantan dicampur dengan seekor betina, sedangkan sistem poligami adalah seekor jantan dicampur dengan 2 hingga 6 ekor betina. Jumlah anak yang disapih meningkat jika sistem perkawinan poligami atau harem.

Bobot lahir mencit adalah bobot badan satu mencit saat dilahirkan. Bobot lahir mencit ditentukan oleh pertumbuhan fetus sebelum lahir atau pertumbuhan selama di dalam uterus. Pertumbuhan sebelum lahir dipengaruhi oleh faktor-faktor:

1. Mutu genetik ternak
2. Umur
3. Bobot badan induk yang melahirkan

4. Pakan induk
5. Suhu lingkungan selama kebuntingan
6. Ukuran plasenta
7. Tekanan iklim

Waktu fetus mulai tumbuh di dalam uterus, fetus memperoleh zat-zat makanan dari induknya. Apabila kekurangan zat-zat makanan dari induk, maka bobot badan anak mencit pada waktu dilahirkan akan subnormal dan kekuatannya akan berkurang.

Kekurangan nutrisi seperti vitamin dan mineral dalam pakan induk selama kebuntingan akan mempunyai pengaruh yang nyata terhadap kekuatan anak mencit dengan namun tidak memperlihatkan pengaruh yang besar terhadap bobot lahir. Bobot lahir yang ringan tidak mempunyai pengaruh terhadap bentuk dewasa bila zat-zat makanan yang diberikan cukup setelah dilahirkan.

Suhu optimal untuk memelihara mencit berkisar antara 21,11-22,22°C dengan kelembaban udara 45-55%. Suhu lingkungan mempengaruhi bobot lahir mencit karena secara langsung mempengaruhi konsumsi ransum. Kondisi suhu yang tinggi mengakibatkan penurunan nafsu makan. Kemungkinan terjadinya defisiensi zat pakan yang diperlukan oleh fetus sangat besar. Kondisi tersebut dapat mengakibatkan bobot lahir rendah. Sebaliknya, bila suhu rendah, nafsu makan induk mencit akan meningkat, sehingga kebutuhan zat pakan terpenuhi, sehingga bobot lahir dapat lebih tinggi. Bobot lahir

anak mencit berkisar antara 0,5-1,5 g per ekor atau antara 1-1,5 g per ekor.

Kemudian dikenal juga istilah bobot sapih anak mencit. Bobot sapih anak mencit adalah bobot badan mencit saat dipisahkan dari induknya. Bobot sapih dipengaruhi:

1. Jenis kelamin
2. Bobot badan induk selama menyusui
3. Umur induk
4. Keadaan pada saat lahir
5. Kemampuan induk menyusui
6. Kuantitas dan kualitas ransum
7. Suhu lingkungan

Tahap penyapihan sebaiknya dilakukan saat umur sapih. Jika terlalu dini, maka pertumbuhan anak mencit akan terhambat. Mencit yang disapih saat umur 14-16 hari pertumbuhannya tidak sebaik mencit yang tetap bersama induknya sampai berumur 20-21 hari. Ada beberapa pendapat mengenai bobot sapih mencit berkisar antara 10-12 g per ekor; 18-20 g per ekor, atau 7,69 g per ekor. Anak mencit baik disapih pada umur 21 hari. Jika induk dipisah dari pejantan saat bunting tua dan induk tidak memanfaatkan estrus *post partum* untuk melaksanakan perkawinan, maka produksi susu dan perawatan anak oleh induk akan lebih lebih optimal sehingga akan menghasilkan bobot sapih lebih baik. Faktor tingkat mortalitas merupakan salah satu tolok ukur atau indikator yang dapat digunakan untuk mengukur kemampuan

dan keberhasilan induk mengasuh anak. Faktor yang mempengaruhi tingkat mortalitas adalah:

1. Jumlah anak sepelahiran
2. Kondisi induk setelah melahirkan
3. Kondisi lingkungan
4. Sistem perkawinan

Kematian anak mencit timbul pada beberapa kondisi misalnya:

1. Ukuran kandang yang terlalu luas sehingga anak mencit kedinginan
2. Banyak sedikitnya anak mencit yang dilahirkan
3. Anak mencit luka atau abnormal
4. Pengaruh kelembaban
5. Suhu kandang yang kurang optimal
6. infeksi virus

G. Penyakit pada mencit

Jika pemeliharaan mencit tidak baik, misal karena kandang kotor tidak pernah dibersihkan, lembab, gizi pakan yang tidak baik dan faktor lingkungan seperti sirkulasi udara, suhu, kelembaban tidak diperhatikan, maka sangat mungkin mencit akan terkena berbagai penyakit. Penyakit pada mencit secara umum dapat dibedakan menjadi penyakit infeksi dan non infeksi. Berikut ini contoh penyakit yang biasa menyerang mencit:

1. Cacar Mencit (*Ectromelia*)

Penyebab: virus *ortopoks*

Gejala: akut, mencit mati segera setelah memperlihatkan gejala sakit kronis, tidak sehat, kaki dan ekor bengkak dengan kulit berlepuh dan lesi ulsuratif

Perubahan pasca mati: pembuluh darah penuh dengan darah, hemoragi organ visceral, lesi nekrotik pada hati dan limfa

Pengendalian : hewan terinfeksi dibinasakan

2. Tyzzer

Penyebab: *Bacillus piliformis*

Gejala: mencret, anoreksia, BB menurun, dapat menyebabkan kematian

Diagnosis: ditemukan bakteri dalam sel – sel epitel usus, nodul – nodul pada hati

Pencegahan: koloni mencit terinfeksi dibinasakan

3. Pseudotuberculosis

Penyebab: *Corynebacterian pseudotuberculosis*

Gejala: lemah dan frekuensi nafas tinggi

Diagnosis: abses pada ginjal, jantung dan hati, namun abses tidak selalu tersifat

Pencegahan: kelompok hewan terinfeksi dibinasakan

4. Salmonellosis

Penyebab: *Salmonella typhimurium*

Gejala: mencret, bulu kasar, BB turun, lemah

Diagnosis: Isolasi organisme dari tinja, darah, hati atau limpha

Pengendalian: kelompok hewan terinfeksi dibinasakan, makanan dan alat tidur disterilkan

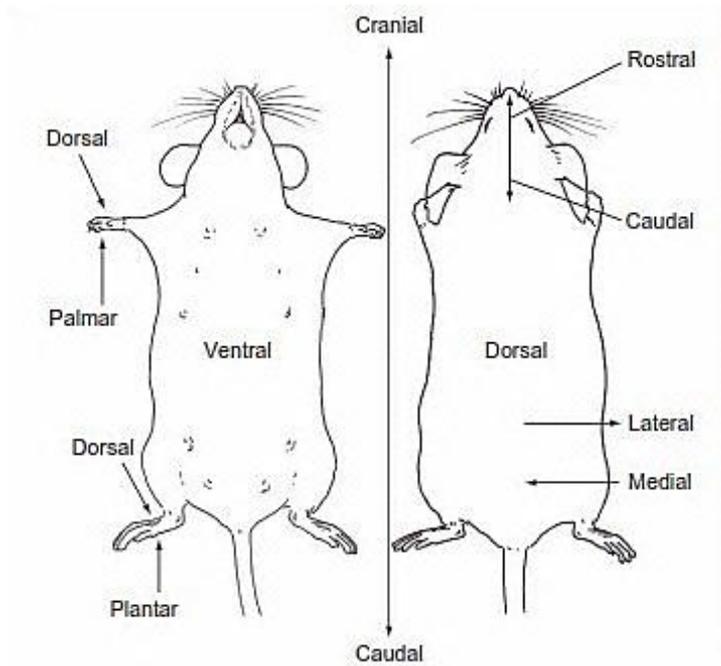
BAB 5 ANATOMI MENCIT

A. Terminologi umum

Untuk memahami anatomi mencit, beberapa istilah di bawah ini perlu dipahami.

1. Cranial = Mengarah ke kepala/cranium
2. Rostral = Mengarah ke hidung/rostrum
3. Caudal = Mengarah ke ekor
4. Ventral = Mengarah ke bagian abdomen
5. Distal = Mengarah ke bagian kaki
6. Proksimal = Menuju tubuh
7. Dorsal = bagian tulang belakang
8. Palmar = Menuju telapak tangan atau telapak kaki

Pada mencit, istilah ventral dan dorsal lebih tepat digunakan daripada anterior dan posterior. Sementara cranial dan caudal digunakan sebagai pengganti superior dan inferior. Proksimal dan distal digunakan pada skeleton appendicular. Medial dan lateral digunakan sebagai acuan posisi relatif terhadap sumbu tubuh.



Gambar 9. Anatomi mencit

B. Sistem respirasi

Respirasi merupakan rangkaian proses meliputi pengambilan gas atau udara, penggunaannya untuk memecah zat, pengeluaran gas sisa pemecahan zat, serta pemanfaatan energi yang dihasilkannya, yang berlangsung di dalam tubuh makhluk hidup.

Secara umum respirasi mempunyai fungsi:

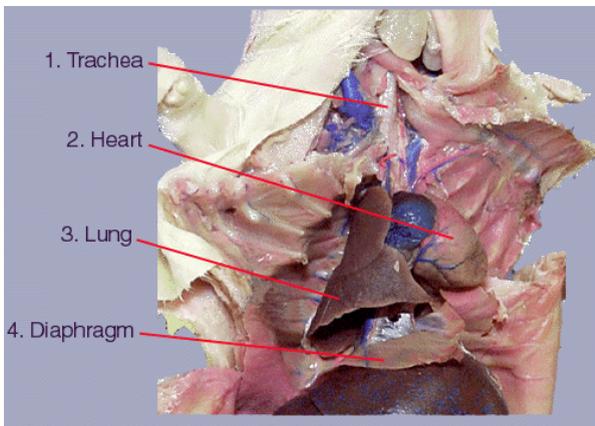
1. Menyediakan permukaan untuk pertukaran gas antara udara dan sistem aliran darah.
2. Sebagai jalur untuk keluar masuknya udara dari luar ke paru-paru.

3. Melindungi permukaan respirasi dari dehidrasi, perubahan temperatur, dan berbagai keadaan lingkungan yang merugikan atau melindungi sistem respirasi itu sendiri dan jaringan lain dari patogen.
4. memfasilitasi deteksi stimulus olfaktori dengan adanya reseptor olfaktori di bagian superior pada rongga hidung.

Saluran respirasi mencit terdiri atas tiga bagian utama yaitu:

1. Saluran respirasi anterior:
Nostril, nasal cavity, nasopharynx
2. Saluran respirasi intermediate:
Larynx, trachea, bronchi
3. Saluran respirasi posterior

Paru-paru. Paru kiri hanya mempunyai lobus tunggal, sementara paru kanan dibedakan menjadi 4 lobus yaitu superior, middle, inferior dan postcaval.



Gambar 10. Sistem respirasi mencit

Seekor mencit dalam kondisi rehat menggunakan sekitar 3.5 mL O₂/gm/jam, sekitar 22 kali lebih besar daripada yang digunakan oleh seekor gajah. Untuk mengakomodasi kebutuhan laju metabolisme yang tinggi, mencit mempunyai tekanan alveolar yang tinggi (PO₂), saluran udara yang pendek, kapasitas O₂ dan kadar gula darah yang tinggi, konsentrasi sel darah merah yang moderate, kandungan hemoglobin di sel darah merah yang tinggi, densitas kapiler yang padat dan konsentrasi enzim *carbonic anhydrase* yang tinggi pula.

C. Sistem Pencernaan

Sistem pencernaan mencit terdiri atas saluran pencernaan dan kelenjar-kelenjar pencernaan yang saling berhubungan. Sistem pencernaan mencit secara umum berfungsi untuk:

- € Ingesti dan digesti makanan.
- € Absorpsi sari makanan.
- € Eliminasi sisa makanan.

Organ-organ pencernaan pada mencit yaitu: gigi yang berada di rongga mulut, esophagus, ventrikulus (lambung), intestinum kecil, coecum dan kolon.

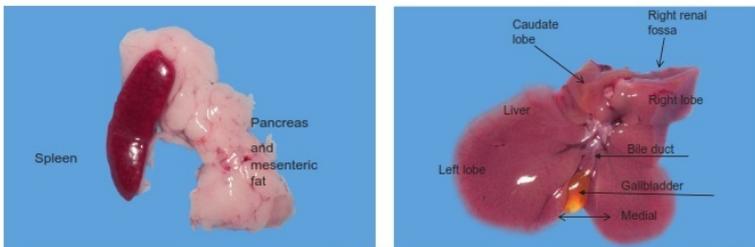
Gigi normal mencit terdiri atas sebuah incisicus dan tiga buah molar di tiap kuadrannya. Perkembangan dan erupsi gigi berawal dari gigi depan ke belakang. Molar ketiga merupakan gigi terkecil di tiap rahang. molar ketiga di bagian atas adakalanya tidak ada pada beberapa mencit liar dan beberapa

strain inbred. pertumbuhan gigi incisivus berlangsung terus menerus dan luruh selama pengunyahan.



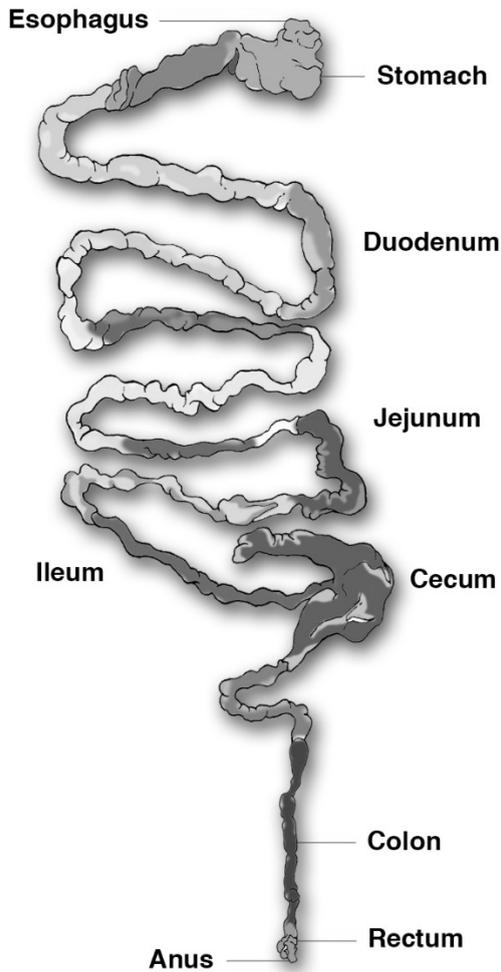
Gambar 11. Anatomi sistem pencernaan mencit.

Gambar kiri: Anatomi abdomen setelah dilakukan penyayatan. Gambar kanan: Perbesaran organ-organ sistem pencernaan mencit. Nampak organ hati, lambung, pankreas dan intestinum.



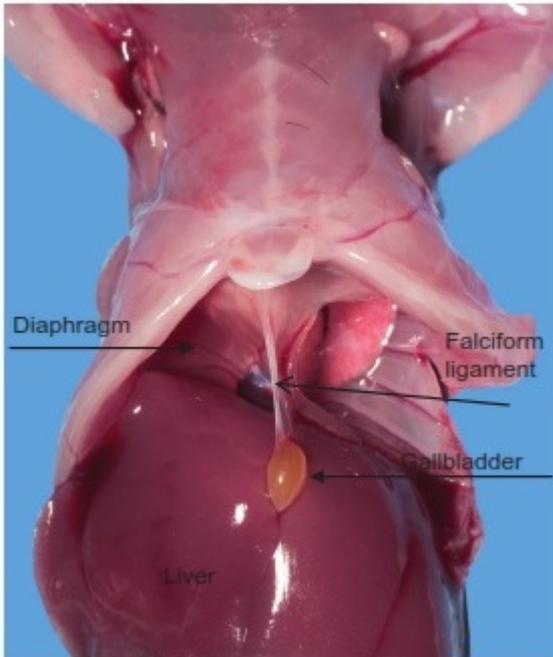
Gambar 12. Organ sistem pencernaan mencit

Gambar kiri: organ pankreas yang berlekatan dengan limpa. Gambar kanan: Organ hati mencit yang terdiri atas 4 lobus.



Gambar 13. Saluran pencernaan menci

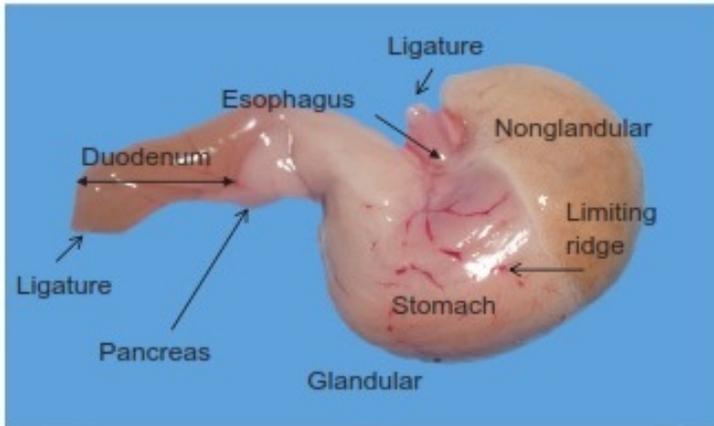
Saluran pencernaan menci, setelah rongga mulut kemudian berlanjut ke esophagus-lambung-intestinum (Duodenum-jejunum-illeum)-kolon-rektum dan berakhir di anus. nampak pula adanya cecum.



Gambar 14. Hati dan kantung empedu mencit

Sementara kelenjar pencernaannya adalah kelenjar saliva (Kelenjar saliva submaksilari pada mencit mensekresikan hanya satu tipe saliva yaitu seromucoid), hepar dan pankreas.

Esophagus mencit berupa saluran yang tersusun atas epitelium squamosa. Bagian ventrikulus mengalami keratinisasi, sementara bagian distal ventrikulus dijumpai kelenjar-kelenjar ventrikulus. Sekret ventrikulus selalu ada, baik ada makanan atau tidak di ventrikulus. Di bagian intestinum mencit dijumpai lebih dari 100 spesies bakteri yang berkoloni dan menguntungkan bagi mencit. Koloni bakteri tersebut meningkatkan resistensi terhadap bakteri patogen lain di intestinum, memproduksi vitamin-vitamin dan fungsi homeostatis.



Gambar 15. Ventrikulus (Lambung) mencit

Pencernaan berawal di mulut dan di rongga mulut, makanan di giling menjadi lebih kecil dengan bantuan gigi dan di basahi oleh saliva. Makanan kemudian disalurkan melalui faring dan esophagus. Makanan kemudian menuju ke lambung dan usus halus. Di dalam usus halus makanan diubah secara kimia menjadi asam-asam amino, monosakarida, gliserida, dan unsur-unsur dasar yang lain. Sementara itu, absorpsi air di usus besar. Feces atau sisa makanan menjadi setengah padat konsistensinya. Feces dikeluarkan dari dalam tubuh melalui kolon dan kemudian ke anus.

D. Sistem limfatik

Organ dan jaringan limfoid secara umum dapat dibedakan menjadi dua kategori utama yaitu organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Organ limfoid primer mempunyai fungsi embriogenesis sel-sel yang berperan dalam respon

imun. Termasuk dalam organ limfoid primer adalah timus. Sementara organ limfoid sekunder berperan sebagai limfopoiesis yang beraksi terhadap stimulasi antigen. Termasuk dalam organ limfoid sekunder adalah limpa dan nodus limfatikus.

Sistem limfatik utama mencit terdiri dari, timus, limpa, nodus limfatikus dan pembuluh limfatikus. Bentuk dari nodus limfatikus seperti kacang dan terdiri atas lapisan kortek dan medula.

Timus tersusun atas sejumlah lobus berepitel longgar. Setiap lobus dibatasi oleh jaringan pengikat. Bagian luar setiap lobulus, yaitu kortek, diinfiltrasi padat dengan limfosit. Bagian dalam yaitu medula sel epitelnya terlihat sangat jelas. Kelenjar timus dapat ditemukan di bagian anterior mediastinum dan terbagi dalam dua lobus dan banyak lobulus, masing-masing terdiri atas kortek dan medula. Sel induk pluripoten yang merupakan prekursor sel T, masuk ke dalam timus, berproliferasi membentuk timosit. Timus pada kelompok rodensia yang baru lahir mempunyai peranan penting, telah dibuktikan bahwa bila timus tersebut dibuang maka hewan menjadi lebih peka terhadap infeksi.

Organ limfatikus mencit selain timus adalah limpa. Limpa berfungsi sebagai filter darah dan penyimpan zat besi (Fe). Simpanan Fe tersebut dimanfaatkan untuk sintesis hemoglobin. Limpa mencit berada di cekungan major ventrikulus. Ukuran dan kenampakan dari limpa mencit berbeda-beda tergantung

dari faktor: umur, strain, jenis kelamin, kesehatan mencit. Limpa mencit jantan lebih besar hampir 50% dari limpa mencit betina. Sebagian besar limfosit masuk dan meninggalkan limpa melalui aliran darah. komponen seluler dan humoral imunitas didistribusikan melalui pembuluh darah dan jaringan oleh pembuluh limfatik efferent dan duktus limfatikus yang mengosongkan diri menuju sistem venosa.

Secara struktural, limpa tersusun atas jaringan pengikat yang tebal (kapsula) yang dilapisi bagian terluar oleh peritonium. Kapsula terdiri atas dua lapisan yaitu jaringan pengikat dan otot polos yang berperanan sebagai jaringan parenkim limpa. Bagian trabekula limpa tersusun atas serabut kolagen, elastis dan otot polos. trabekula limpa mempunyai arteri, vena dan pembuluh limfa serta jaringan saraf. Di bagian limpa juga dijumpai pulpa merah dan pulpa putih.

Pulpa merah menyimpan eritrosit, penjerat antigen dan fungsi eritopoesis. Sebagian besar pulpa limpa berwarna merah dan mengandung banyak darah dan tersimpan dalam jalinan retikuler. Pulpa merah tersusun atas arteriol pulpa, kapiler selubung dan kapiler terminal serta sinus venous atau venula.

Pulpa putih merupakan jaringan limfatik periarterial atau dikenal dengan *Periarterial Lymphatic sheaths* (PALS). Serabut retikuler dan sel retikuler membentuk jalinan stroma dan mengandung pecahan limfosit, makrofag serta sel-sel asesori lainnya. Di bagian pulpa putih ini terjadi tanggap kebal.

Bagian sistem limfatik mencit lain adalah nodus limfatikus. Nodus limfatikus berbentuk bulat atau seperti kacang, berada di tempat strategis saluran limfatikus sehingga menjerat antigen bagian perifer tubuh menuju aliran darah. Nodus limfatikus tersusun atas jaringan-jaringan retikuler dengan limfosit, makrofag dan sel dendrit. Secara struktural, nodus limfatikus terbagi atas: korteks perifer, medula pusat dan daerah tidak beraturan antara bagian korteks dan medula disebut daerah parakortikal.

Dalam sistem limfatik, untuk menghancurkan toksin, bahan-bahan infeksius selain mekanisme fagositosis, limfosit akan membentuk antibodi. Limfosit berfungsi sebagai natural killer yang dapat menghancurkan sel-sel asing dan penghasil antibodi terhadap respon spesifik.

Dalam kondisi normal, mencit mempunyai jumlah limfosit 55-85% dari total leukosit. Limfosit tersebut berdiferensiasi menjadi Sel T dan Sel B yang berfungsi dalam respon imun tubuh mencit. Sel T berfungsi dalam imunitas seluler dan jumlahnya 70-75% dari seluruh limfosit darah. Sementara itu, Sel B menghasilkan antibodi pada respon imun humoral.

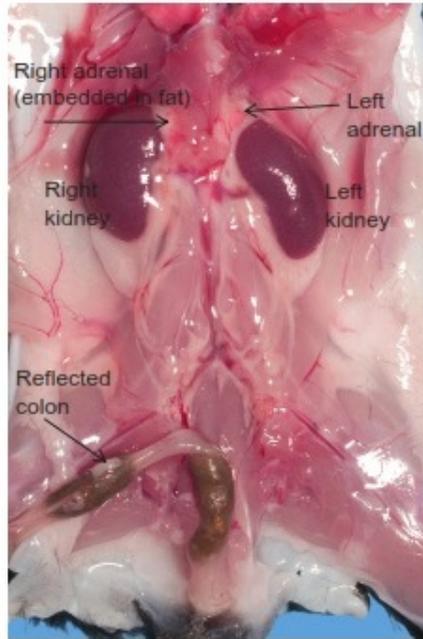
E. Sistem urinaria

Sistem urinaria mencit tersusun atas organ-organ: ginjal, ureter, kantung urin atau vesica urinaria dan urethra. Sepasang ginjal berada di area retroperitoneal. Ginjal kanan normalnya berada lebih anterior daripada ginjal kiri. Ginjal dari berbagai

inbred strain mencit jantan lebih berat massanya daripada ginjal betina. Glomeruli mencit kecil atau hanya berukuran setengah dari glomeruli tikus. Namun jumlahnya sebanyak glomeruli tikus dan permukaan penyaringan per gram jaringan dua kali dari pada tikus.

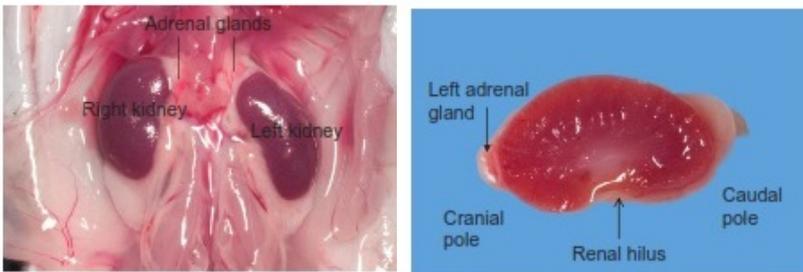
Mencit hanya mengeluarkan urin satu atau dua tetes setiap urinari namun sangat pekat. Konsentrasi yang tinggi atau pekat tersebut dikarenakan struktur *loop of Henle* yang panjang dan adanya *vasa recta* yang berasosiasi dengan *loop of Henle* di bagian medula ginjal. Mencit dapat memekatkan urine hingga 4300 mOsm/liter, lebih pekat jika dibandingkan dengan manusia yang hanya 1160 mOsm/liter.

Normalnya, mencit mengekskresikan sejumlah besar protein di urine. Taurine adalah salah satunya yang selalu ada di urine mencit, sedangkan triptopan selalu tidak dijumpai. Kreatinin juga diekskresikan di urine mencit. Kreatinin: kreatin rasio mencit yang dipuaskan sekitar 1:14. Mencit juga mengekskresikan lebih banyak alantoin daripada asam urat.



Gambar 16. Sistem urinaria mencit.

Abdomen mencit. Bagian gastrointestinal dan saluran reproduksi dipisahkan untuk memperlihatkan sistem urinaria. Ginjal berada di bagian atas abdomen. Kelenjar adrenal berada di cranial ginjal. Ginja kanan berada di cranial sebelah kiri



Gambar 17. Kelenjar adrenal dan ginjal mencit.

Gambar kiri: Ginjal diselubungi oleh mencit dan dapat dibedakan dari warnanya yaitu kuning oranye karena adanya produksi hormon steroid. Gambar kanan: potongan melintang ginjal mencit sebelah kiri.



Gambar 18. Letak kantung urine menci

Berikut ini adalah karakteristik dan komponen urine menci.

Tabel 8. Karakteristik dan komponen urine menci

Jumlah urine	0.5-1 mL/24 jam
pH	7.3-8.5
Titerable acidity	4.68-5.67 mg/24 jam
Mean specific gravity	1.058
Osmolalitas	1.06-2.63 osmol/kg
Total padatan (Solid)	12.1-16.1 gm/100gm
Klorida	5.75-5.79 mg/24jam
Total Sulfur Inorganik	0.27%
Sulfat Inorganik	0.15%
fosfor Glukosa	0.43%
Protein	1.98-3.09 mg/24 jam
Total Nitrogen	6.8-25.8 mg/24 jam
Ammonia nitrogen	40.2-40.8 mg/24 jam
Urea nitrogen	4.68-5.68 mg/24 jam
Asam urat	24.3-29.8 mg/24 jam
Kreatin	0.04%
Kreatinin	0.86-1.02 mg/24 jam
Taurine	0.57-0.67 mg/24 jam
Allantpoin	11.98 (9.39-14.64) mg/kg/hari
Assam Homovanilik	95 (75-117)µmoles/kg/hari
Leucin	40 µg/kg/hari
Valin	0.86 mg/hari (diet 10% kasein)
Histidin	0.91 mg/hari
Alanin	0.27 mg/hari
	0.53 mg/hari

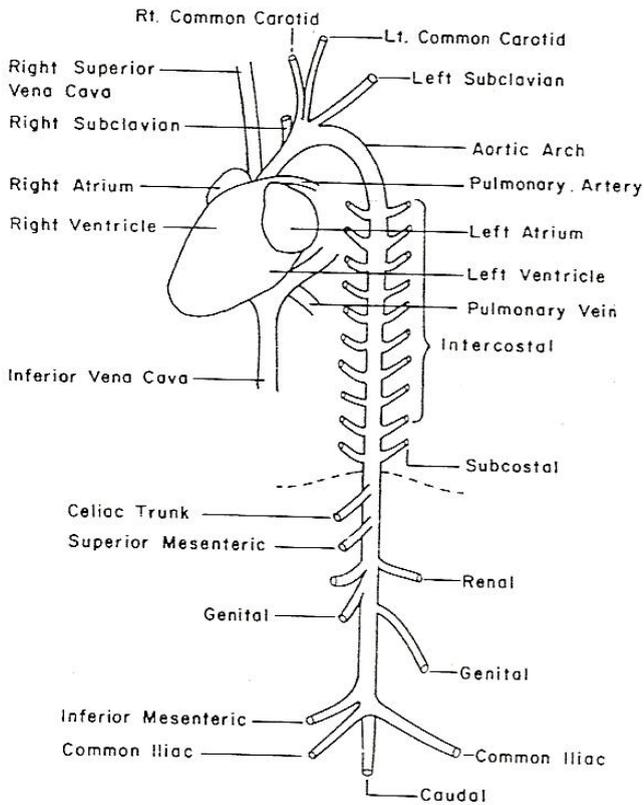
Deoksisitidine	125-625 µg/kg/hari
4-amino-5-imidazole-karboxamide	260µg/kg/hari

Sumber: Kaplan, et al., 1983 in Jacoby, R. O., Fox, J. G., & Davisson, M. (2002). Biology and diseases of mice. Laboratory animal medicine, 2, 35-120.

H. Sistem kardiovaskuler

Secara umum, sistem kardiovaskuler atau pembuluh darah pada mencit mirip dengan sistem peredaran darah pada manusia. Organ utama adalah jantung beserta dengan pembuluh darah seperti aorta, arteri dan vena.

Jantung mencit beruang empat, dinding atrium tipis dan dinding ventrikelnya tebal. rata-rata tekanan darah sistolik berkisar dari 84 hingga 105 mm Hg. Peningkatan temperatur tidak serta merta meningkatkan tekanan darah pada mencit. Denyut jantung, *Cardiac output* dan lebar myofiber jantung berhubungan dengan ukuran hewan. Denyut jantung berkisar antara 310 hingga 840 per menit pada mencit dan nilai tersebut bervariasi lebar baik laju dan tekanan darah di antara strain mencit.



Gambar 19. Jantung dan pembuluh darah utama
 Sumber: Jacoby, R. O., Fox, J. G., & Davisson, M. (2002). *Biology and diseases of mice. Laboratory animal medicine*, 2, 35-120.



Gambar 20. Jantung mencit

Berikut ini disajikan nilai normal hematologi, komposisi kimia darah dan fisiologi dari sistem kardiovaskuler menciit.

Tabel 9. Data-data sistem sirkulasi menciit

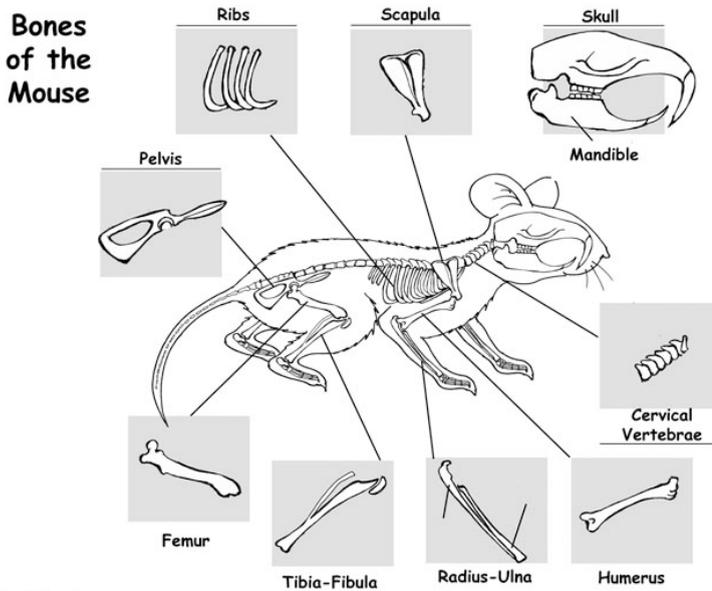
Denyut jantung	310-840 denyut per menit (beat per minute = bpm)
Tekanan darah	
Sistol	133-160 mm Hg
Diastol	102-110 mm Hg
Volume darah	
Plasma	3.15 mL/100 gm
Total	5.85 mL/100 gm
Frekuensi respirasi	163/menit
Volume tidal	0.18 (0.09-0.38) mL
Volume menit	24 (11-36) mL/menit
Volume stroke	1.3-2.0 mL/denyut (beat)
Plasma	
pH	7.2-7.4
CO ₂	21.9 moles mM
Tekanan CO ₂	40 + 5.4 mm Hg
Hitung leukosit	
Total	8.4 (5.1-11.6) x 10 ³ /μL
Neutrofil	17.9 (6.7-37.2) %
Limfosit	69 (63-75) %
Monosit	1.2 (0.7-2.6) %
Eosinofil	2.1 (0.9-3.8) %
Basofil	0.5 (0-1.5) %
Keping darah	600 (100-1000) x 10 ³ /μL
PCV (Packed Cell Volume)	44 (42-44) %
Sel darah merah	8.7-10.5 x 10 ⁸ /mm ³
Hemoglobin	13.4 (12.2-16.2) gm/dL
Maksimum volume pendarahan tunggal	5 Ml/kg
Waktu pembekuan darah	2-10 menit
PTT	55-110 detik
Waktu prothrombin	7-19 detik

Sumber: (Jacoby & Fox 1984)

I. Sistem Skeletal

Sistem skeleton tersusun atas dua komponen utama yaitu: Skeleton aksial dan skeleton appendikuler. Skeleton aksial terdiri atas tengkorak, vertebrae, rusuk, dan sternum.

Sementara skeleton appendikuler tersusun atas pektoral, pelvis dan tungkai. Rumus vertebrae untuk mencit adalah C7T13L6S4C28 dengan beberapa variasi di antara strain, khususnya pada thorak dan daerah lumbar.

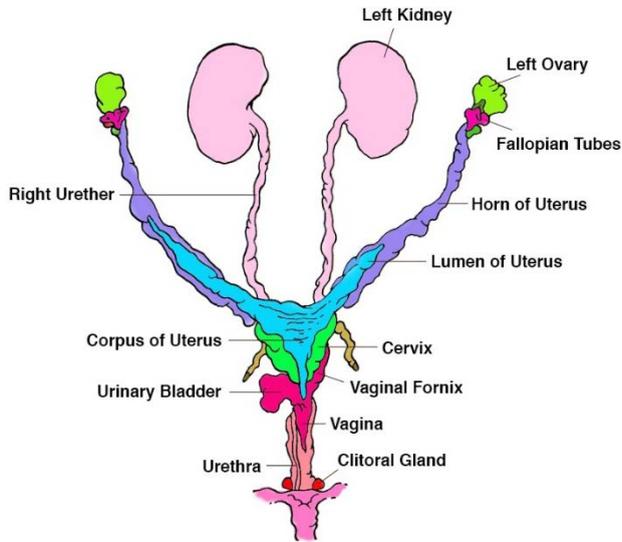


Gambar 21. Skeleton mencit.

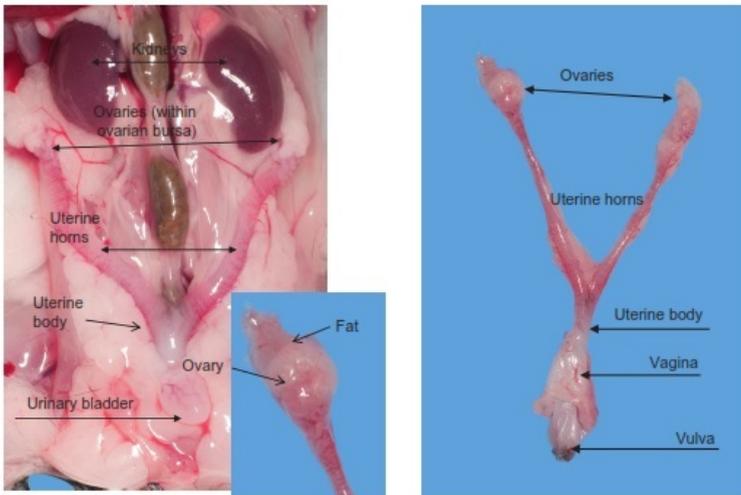
Sumber: <http://www.akitarescueoftulsa.com/mouse-bones-diagram/>

J. Sistem reproduksi

Organ reproduksi utama mencit betina terdiri atas: ovarium, oviduct dan uterus. Sementara organ reproduksi mencit jantan berupa, testis beserta salurannya seperti ductus deferens, ductus ejakulatorius dan kelenjar asesories. Organ-organ reproduksi tersebut pada umur 10-12 minggu, baik mencit jantan maupun betina, sudah mencapai kematangan seksual.



Gambar 22. Sistem reproduksi betina



Gambar 23. Anatomi organ reproduksi betina

Organ reproduksi jantan terdiri atas saluran reproduksi yaitu: vas eferens, epididimis, vas deferens, duktus ejakulatorius dan uretra. Vas eferens merupakan saluran

berkelok-kelok dengan lumen dibatasi oleh kelompok sel epitel bersilia. Epididimis terdiri dari bagian caput, corpus dan cauda. Epididimis berfungsi sebagai tempat pematangan atau maturasi spermatozoa dan tempat penyimpanan sementara spermatozoa. Pematangan spermatozoa ditandai dengan hilangnya protoplasmik droplet bagian kepala spermatozoa.

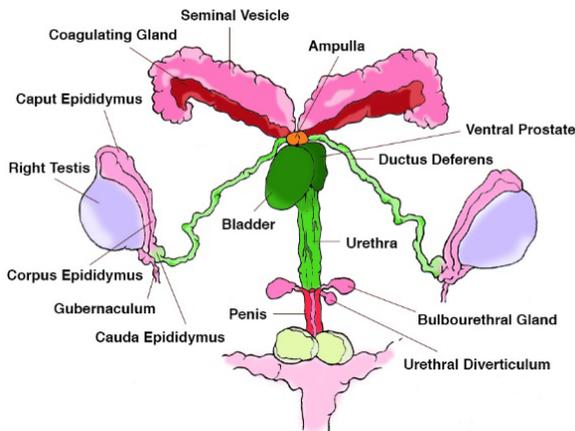
Epididimis pada bagian caput berfungsi untuk penyerapan cairan yang dikeluarkan oleh testis. Fungsi lain epididimis adalah memberikan sekresi cairan yang diproduksi oleh sel-sel epitelnya untuk membantu perubahan morfologi akrosom yaitu melalui kondensasi inti, pelepasan sitoplasma, peningkatan muatan negatif dan penambahan lapisan glikoprotein. Spermatozoa yang berasal dari epididimis akan diteruskan menuju ke vas deferens.

Lumen vas deferens tersusun atas sekelompok sel epitel kolumnar berlapis semu. Vas deferens dibungkus oleh lapisan otot longitudinal di bagian luar dan dalamnya, sedangkan lapisan otot sirkuler terletak diantara keduanya. Lanjutan vas deferens adalah duktus ejakulatorius.

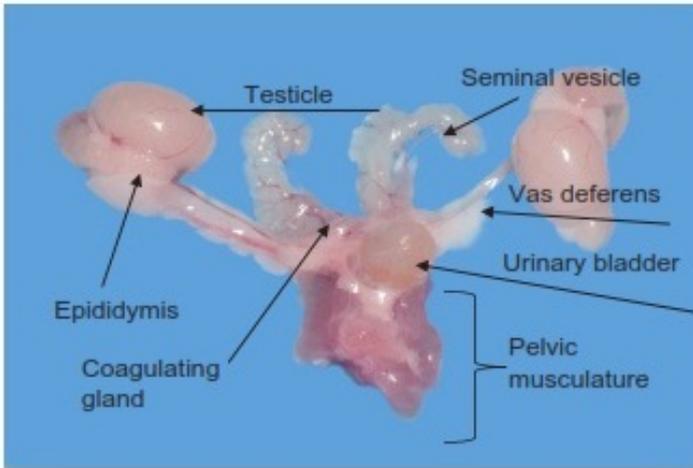
Duktus ejakulatorius memiliki otot-otot yang kuat dan berperan selama ejakulasi. Saluran ini akan bermuara pada uretra. Uretra tersusun atas sekelompok sel epitel transisional, jaringan ikat longgar, banyak terdapat pembuluh darah dan dibungkus lapisan otot lurik yang tebal.

Di samping saluran-saluran utama, alat reproduksi jantan dilengkapi dengan kelenjar-kelenjar aksesori. Kelenjar seks

aksesori genitalia jantan yaitu: vesikula seminalis, kelenjar koagulasi, ampula, bulbouretra dan kelenjar preputialis. Fungsi kelenjar seks asesori secara umum adalah mengeluarkan sekret cairan berupa plasma semen yang berfungsi sebagai medium pelarut dan sebagai pengaktif sperma karena semen adalah substrat yang kaya akan natrium, kalium klorida, nitrogen, asam sitrat, asam askorbat, inositol, fruktosa, fosfatase dan sedikit vitamin. Penis sebagai organ kopulasi berfungsi untuk menyalurkan spermatozoa ke dalam saluran reproduksi betina. Penis terdiri dari bagian-bagian: korpus kavernosum penis, korpus kavernosum uretra, preputialis.



Gambar 24. Sistem reproduksi jantan (Skematis)



Gambar 25. Organ reproduksi jantan

Periode aktivitas reproduksi berlangsung sejak umur dewasa seksual hingga mencit berumur 14 bulan dan biasa lebih lama lagi pada mencit jantan. Seperti pada mamalia betina pada umumnya, mencit betina hanya akan berkopulasi dengan mencit jantan selama fase estrus, yaitu ketika sel telurnya telah siap untuk dibuahi. Kadang-kadang kopulasi dapat terjadi pada waktu antara 5 jam sebelum ovulasi sampai 8 jam setelah ovulasi.

Fase estrus mencit sendiri dapat ditentukan dengan melihat ciri alat kelamin luarnya yaitu vulva yang membengkak dan berwarna kemerahan. Untuk lebih memastikan tahapan fase siklus estrus, apusan vagina dapat dibuat dan digunakan untuk menganalisa tahapan fase estrus. Banyaknya sel-sel epitel menanduk pada apusan vagina menunjukkan bahwa mencit berada pada fase estrus. Biasanya fase estrus mencit

dimulai pada tengah malam dan kopulasi alami terjadi sekitar pukul 02.00 menjelang pagi. Sperma yang diejakulasikan ke dalam vagina pada waktu kopulasi akan mencapai oviduct dalam beberapa menit. Mobilitas dan viabilitas sperma dipertahankan selama 8 jam setelah ovulasi. Keberhasilan perkawinan mencit ditandai dengan adanya sumbat vagina merupakan hari kehamilan ke-0. Zigot akan mengalami perkembangan menjadi embrio. Segala kebutuhan embrio diperoleh melalui induk melalui organ ekstra embrio yaitu plasenta. Pembentukan plasenta dimulai dari kehamilan ke-8,5. Periode kehamilan mencit biasanya berlangsung 9-21 hari.

Embrio mencit merupakan eukariota diploid multisel dalam tahap paling awal perkembangan organisme yang berkembang biak secara seksual, ketika sebuah sperma membuahi sebuah ovum. Embrio hasil pembelahan zygot secara mitosis ini memiliki seluruh DNA dari kedua induknya. Dalam hewan, perkembangan zygot menjadi embrio terjadi melalui tahapan yang dikenal sebagai blastula, gastrula, dan organogenesis. Segala kebutuhan nutrisi, sirkulasi darah, zat-zat yang hasil metabolisme embrio difasilitasi oleh organ ekstra embrio yaitu plasenta. Plasenta terbentuk mulai dari kehamilan ke-8,5.

Periode pertumbuhan embrio terdiri atas lima periode:

1. Periode persiapan
2. Periode pemuahan
3. Periode pertumbuhan awal

4. Periode antara

5. Periode pertumbuhan akhir

Periode persiapan, kedua indukan disiapkan untuk melakukan perkawinan. Periode pembuahan, kedua indukan mengadakan perkawinan, kemudian gamet melakukan perjalanan ke tempat pembuahan, Kedua jenis gamet melakukan fertilisasi. Setelah fertilisasi terjadi, zygote yang terbentuk segera terimplantasi dan berlangsung bila endometrium berada dalam fase sekresi. Kelenjar-kelenjar di uterus ini banyak mengandung glikoprotein dan glikogen. Pembuluh-pembuluh darah mengalami pelebaran. Sementara itu lapisan lamina propria mengalami sedikit pembengkakan dan penebalan pada endometrium. Endometrium kemudian mengalami penebalan hingga 5 mm. Kondisi di atas terjadi akibat progesteron yang disekresikan korpus luteum. Tanda awal pengaruh progesteron dapat dikenali 2-3 hari setelah ovulasi.

BAB 6 MENCIT DALAM PENELITIAN

A. Prosedur umum

Prosedur penanganan hewan uji di laboratorium harus mendapat perhatian khusus, termasuk sifat-sifat dan karakter dari hewan uji. Hal ini dimaksudkan agar hewan tidak dalam kondisi stres ketika masa percobaan berlangsung sehingga dapat berakibat hasil penelitian menjadi tidak baik. Untuk itu perlu diketahui sifat dan karakter dari hewan uji seperti tikus, kelinci, dan mencit.

Hewan uji mencit, merupakan hewan yang cenderung berkelompok, sedikit penakut dan tidak tahan dengan sinar yang terang (fotophobia), termasuk dalam hewan nokturnal (beraktivitas lebih pada malam hari), butuh ketenangan di sekitar area pemeliharaannya dan jarang menggigit.

Jika dibandingkan dengan tikus, mencit lebih fotophobia, perlu juga ketenangan di sekitar area pemeliharaan. Bila dalam keadaan defisiensi makanan atau minum dan merasa terganggu, cenderung responsif, galak dan terkadang menyerang bahkan menggigit.

Mencit sebaiknya ditempatkan dalam kotak yang terbuat dari aluminium, baja tahan karat ataupun kaca. Prinsip utamanya adalah, kandang tersebut mudah dibersihkan dan disterilkan. Hal penting lainnya adalah pemilihan bahan harus tepat mengingat mencit atau tikus merupakan hewan pengerat. Bahan kandang dari polivinil carbon (PVC) atau plastik tidak

begitu disarankan karena lunak dan dapat dikerat oleh mencit atau tikus.

B. Menandai mencit (Tagging)

Penandaan hewan uji sangatlah penting dan perlu dilakukan dengan metode yang benar. Jika hewan ditandai maka perlu dicantumkan metode penandaan dalam proposal maupun laporan penelitian. Metode penandaan mencit dapat dilakukan dengan mempertimbangkan umur mencit, jumlah karakter yang akan dimasukkan dalam penelitian dan lama waktu penelitian.

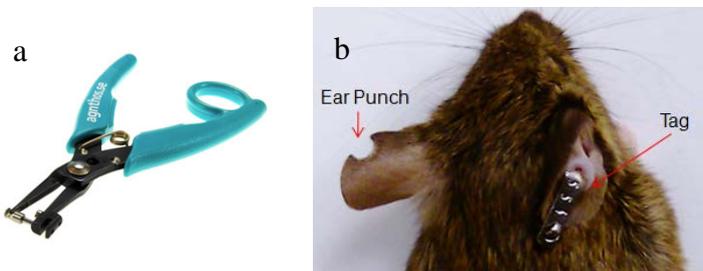
Setelah dilakukan penandaan atau tagging perlu sekali untuk mencatat informasi-informasi penandaan pada kandang pemeliharaan dan database *log book* penelitian. Penggunaan marker yang bersifat non permanen dapat digunakan untuk tagging yang bersifat sementara atau kurun waktu tidak panjang. (3-4 hari). Untuk keperluan tersebut dapat menggunakan olesan cairan asam pikrat, spidol anti air atau cairan penanda lainnya yang tidak bersifat korosif namun setidaknya tahan lama dan tidak luntur oleh air.

Beberapa cara penandaan hewan laboratorium khususnya mencit dilakukan untuk mengetahui kelompok hewan yang diperlakukan berbeda dengan kelompok lain. Penandaan ini dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang (kronis), sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang, yaitu: dengan *ear tag* (anting bernomor), tato pada ekor, melubangi daun telinga dan elektronik

transponder. Cara terakhir merupakan cara paling modern dengan menggunakan microchip (Misal JAXTag™), yang dapat digunakan untuk tagging. Microchip tersebut dilengkapi dengan software yang memudahkan untuk pendataan



Gambar 26. Penandaan mencit sementara

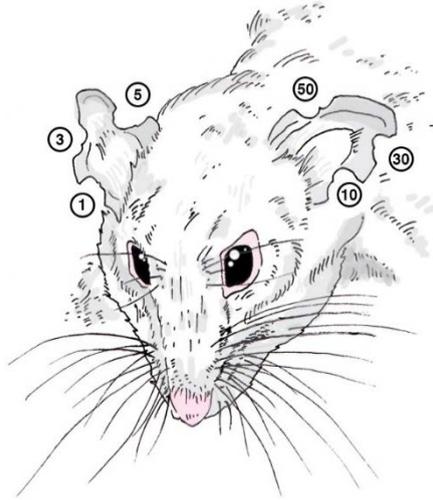


Gambar 27. Alat penanda mencit percobaan

Sumber: a) www.braintreesci.com/prodinfo.asp?number=EP-SA b) www.e-mouselab.com/manual/Mouse/Add%20New%20Mice.html

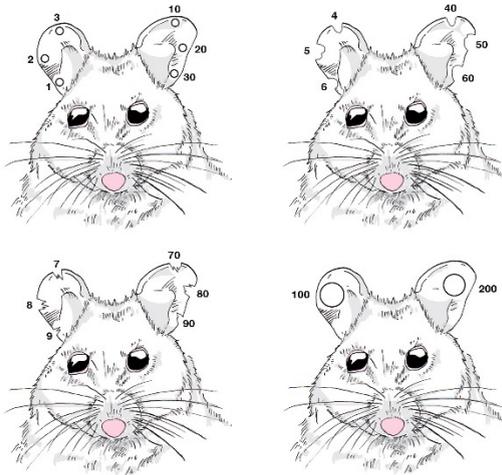
Mencit dapat ditandai dengan melakukan penggungtingan pada daun telinga. Telinga sebelah kanan merupakan nomor

satuan, sedangkan sebelah kiri merupakan nomor puluhan. Berikut ini contoh aturan penomoran mencit dewasa pada daun telinga.

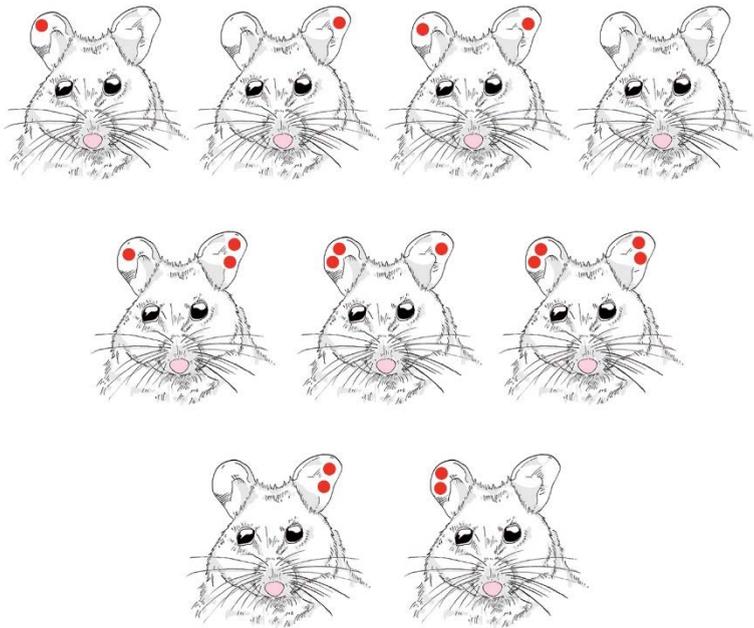


Gambar 28. Salah satu cara tagging mencit

contoh lain aturan penomoran mencit pada daun telinga.



Gambar 29. Cara lain tagging pada mencit



Gambar 30. Alternatif lokasi tagging mencit

Untuk mencit dewasa, penanda yang akan ditaruh ditelingga (ear punch) harus dibersihkan dengan alkohol dahulu agar steril. Kemudian penanda telinga tersebut harus diletakkan kira-kira 3 mm dari pinggir pinna telinga. Jika terlalu dekat ke pinggir pinna telinga, maka akan menyobek dan menyulitkan pembacaan tagging. Jika diletakkan terlalu dalam, maka akan melukai hewan mencit.

Untuk penandaan dengan ear transponder atau microchip pada dasarnya meletakkan ear punch teknisnya sama. Hanya saja, alat tersebut sudah dilengkapi dengan program untuk identifikasi dan dapat dibaca dengan microchip identification. Berikut gambar mengenai microchip transponder untuk keperluan tagging mencit.



Gambar 31. Microchip transponder tagging mencit

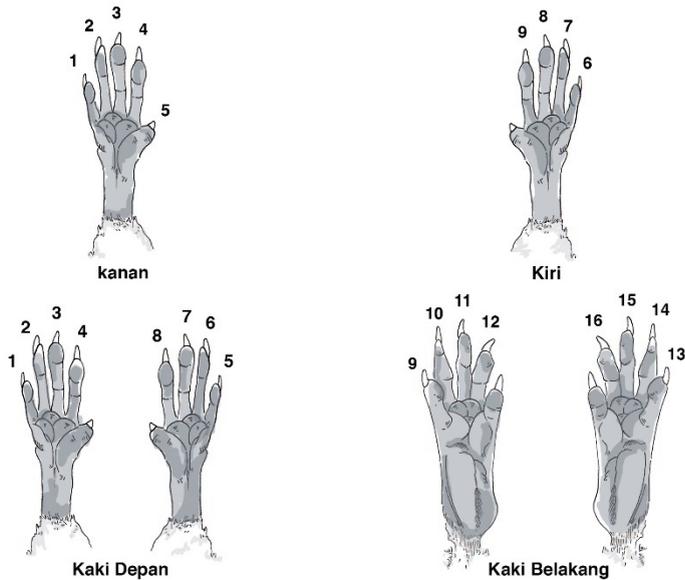
Metode lain yang dapat digunakan untuk tagging permanen mencit adalah metode tato. Metode ini dapat digunakan baik untuk mencit dewasa atau anak mencit. Anestesia tidak diperlukan untuk menggunakan metode ini, namun dapat pula digunakan apabila menginginkan hewan tidak berontak pada saat dilakukan tato.

Untuk melakukan tato ini, perlu alat dan cairan khusus. Tato dapat dilakukan di bagian ekor atau telapak kaki untuk anak mencit dan mencit dewasa. Untuk melakukan teknik ini tentu saja diperlukan latihan terlebih dahulu.



Gambar 32. Alat tatto dan tato di bagian ekor

Sementara itu, penomoran untuk anakan mencit dapat dilakukan dengan memotong jari-jari kaki. Pemberian nomor anak mencit yang baru lahir disesuaikan dengan jumlah anak sepelahiran dari tiap induk dengan cara memotong jari-jari kaki. Pemotongan jari kaki dilakukan dengan gunting kuku pada saat penimbangan bobot lahir. Gambar berikut memperlihatkan aturan penomoran anak mencit pada jari kakinya.



Gambar 33. Penandaan anak mencit

Gambar atas: Penomoran anak mencit yang berasal dari jumlah anak satu kelahiran 1-9 ekor (kaki depan). Gambar bawah: Penomoran anak mencit yang berasal dari jumlah anak satu kelahiran di atas 10 ekor.

C. Prosedur memegang mencit

Berikut ini dijabarkan beberapa teknik memegang mencit, tikus dan kelinci yang akan diperlakukan dengan bahan uji atau sediaan. Ujung ekor mencit diangkat dengan tangan kanan dan ditempatkan pada permukaannya tidak licin, misal kawat penutup kandang, sehingga ketika ditarik, mencit akan mencengkram dan lebih mudah untuk memegang. Kulit tengkuk mencit kemudian dijepit dengan telunjuk dan ibu jari tangan kiri, sementara ekornya tetap dipegang dengan tangan kanan. Posisi tubuh mencit dibalikkan, sehingga permukaan perut menghadap ke arah pemegang, ekor dijepitkan antara jari manis dan kelingking tangan kiri.



Gambar 34. Teknik memegang mencit

BAB 7. PENGAMBILAN DARAH MENCIT

Pengambilan darah mencit harus mempertimbangkan jumlah serta teknik pengambilan darah. Jumlah darah yang diambil untuk sampel data disarankan tidak terlalu banyak volumenya karena akan menimbulkan *hipovolemik shock*.

Hipovolemik shock merupakan kondisi kehilangan darah dan cairan jaringan dari tubuh dan menyebabkan jantung tidak dapat memompa cukup darah ke tubuh, kondisi ini menyebabkan berbagai organ berhenti bekerja (Heller 2014). Untuk menggantikan darah dan cairan yang hilang akibat pengambilan darah tersebut hewan uji perlu diberikan cairan pengganti atau disebut *exsanguinis* yaitu berupa larutan garam fisiologi NaCl 0.9% atau larutan glukosa 5%. Adapun total darah maksimal yang dapat diambil dari hewan uji: 10% total volume darah setiap 2-4 minggu atau hanya 1% dari total volume darah setiap 24 jam.

Sementara itu, darah mencit dapat diambil dari lokasi-lokasi sebagai berikut:

- a. Vena lateral di ekor
- b. Vena saphena kaki
- c. Intrakardial
- d. Sinus orbitalis mata

A. Pengambilan darah dari vena lateral di ekor

Berikut ini adalah langkah-langkah pengambilan darah melalui vena lateral di ekor mencit:

- € Ekor mencit dipegang dengan tangan kanan, biarkan kaki depannya mencengkram kawat penutup kandangnya.
- € Jepit tengkuk mencit atau tikus dengan tangan kiri dengan ibu jari dan jari telunjuk
- € Pindahkan jepitan ekor dari tangan kanan ke tangan kiri, agak ditarik sedikit sehingga bagian kulit abdomennya menegang
- € Ketiga langkah di atas juga dapat diganti dengan memasukkan tikus ke dalam sebuah selongsongan dengan seukuran badan mencit atau tikus
- € Ekor kemudian dipotong (0.2-2 cm) dari pangkal ekor dengan menggunakan gunting.
- € Darah yang mengalir diteteskan ke kaca objek atau ditampung dengan tabung darah (eppendorf) dan dimiringkan dengan sudut 45 derajat.
- € Darah siap digunakan untuk keperluan penelitian. Pengambilan darah dengan metode ini biasa digunakan untuk pengecekan gula darah, kadar kolesterol atau pembuatan sediaan apusan darah. Jika diperlukan untuk pengamatan serum, darah dapat dibiarkan dalam suhu ruangan dan disentrifugasi untuk mendapatkan serum.



Gambar 35. Pengambilan darah di vena lateral ekor
Sumber: https://theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html

B. Pengambilan darah dari vena saphena kaki

Berikut ini dijelaskan langkah-langkah pengambilan darah mencit dari bagian vena saphena kaki.

- € Mencit atau tikus dipegang dengan cara seperti gambar 6. Posisi hewan tersebut dibuat tegak
- € Jarum untuk mengambil darah diinjeksikan di bagian paha belakang sebelah dalam. Usahakan posisi jarum tidak berubah
- € Darah kemudian dapat dan ditampung di eppendorf



Gambar 36. Pengambilan darah vena sapena kaki belakang.
Sumber: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>

C. Pengambilan darah intrakardial

Pengambilan darah ini biasa dilakukan jika darah yang diperlukan dalam jumlah banyak dan kemudian Mencit dikorbankan untuk dibedah. Berikut ini langkah-langkah pengambilan darah dengan teknik intracardial:

- € Mencit dianestesi dengan cara yang telah dijelaskan sebelumnya
- € Untuk pengambilan darah dapat dilakukan langsung dengan cara menusukkan jarum suntik langsung ke jantung dan disedot perlahan (Yokozawa et al. 2002). Cara lain, mencit dapat dibedah dulu kemudian baru jarum ditusukkan langsung ke bagian jantung.
- € Darah yang didapat segera digunakan untuk keperluan penelitian

D. Pengambilan darah dari sinus orbital mata

Pengambilan darah dari bagian sinus orbital mata memerlukan ketrampilan, sehingga hanya bagian sinus orbital yang akan ditusuk dengan mikrohematokrit.

- € Siapkan mikrohematokrit dan tabung hematokrit
- € Goreskan mikrohematokrit tersebut ke bagian sinus orbitalis atau medial canthus mata di bawah bola mata ke arah foramen opticus, sementara ujung yang lain di siapkan tabung hematokrit sebagai tempat penampung darah
- € Putar mikrohematokrit hingga melukai plexus tersebut, jika mikrohematokrit diputar sebanyak 4x maka harus dikembalikan juga sebanyak 4x

€ Darah yang keluar dapat segera ditampung di eppendorf yang telah berisi larutan antikoagulant dan siap digunakan untuk keperluan penelitian.

BAB 8 TEKNIK PEMBERIAN SIMPLISIA

Teknik pemberian obat atau sediaan tergantung dari tujuan penelitian, macam dan sifat sediaan. Pemberian obat atau sediaan sangat berpengaruh terhadap hasil penelitian, sehingga sangat perlu diketahui teknik-tekniknya. Berikut ini akan diuraikan berbagai macam teknik pemberian obat atau sediaan.

A. Pemberian secara oral

Percobaan dengan menggunakan hewan mencit atau tikus, pemberian obat maupun sediaan dapat menggunakan teknik per oral. Pemberian obat secara oral merupakan teknik paling umum dilakukan karena relatif mudah, praktis dan murah. Namun ada beberapa kerugiannya yaitu: banyak faktor dapat mempengaruhi bioavailabilitasnya (faktor obat, faktor penderita dan adanya interaksi dalam absorpsi di saluran cerna). Sifat absorpsi obat mempunyai sifat-sifat tersendiri (Ansel 1989).

Teknik pemberian secara oral ini sangat mudah dilakukan untuk hewan uji seperti mencit atau tikus. Mencit atau tikus dipegang dengan cara yang telah diuraikan bab sebelumnya, sehingga posisi hewan uji lurus. Suntikan oral (kanul) dapat dimasukkan ke mulut hingga oesophagus. Posisi suntikan berkanul juga harus dalam posisi tegak lurus. Larutan

obat atau sediaan dalam suntikan berkanul ditempelkan pada langit-langit mulut atas mencit, kemudian dimasukkan dengan hati-hati sampai ke esofagus dan cairan obat dimasukkan.

B. Subkutan

Pemberian obat atau sediaan secara subkutan pada mencit dapat dilakukan di bagian bawah kulit daerah tengkuk (leher bagian atas). Teknik yang tepat adalah mencubit kulit di leher bagian atas dan kemudian obat dapat diberikan dengan suntikan dengan sudut 45 derajat. Bagian subkutan lain yang dapat digunakan untuk pemberian obat atau sediaan adalah kulit abdomen. Sementara itu jarum suntik yang digunakan untuk mencit dapat menggunakan alat suntik (syringe dan jarumnya) berukuran 1 mL atau menyesuaikan.

C. Intravena

Teknik pemberian obat atau sediaan secara intravena pada mencit dan tikus dilakukan dengan bantuan holder atau alat bantu pemegang hewan uji dan diusahakan ada lubang untuk ekor. Sebelum penyuntikan, ekor dapat dimasukkan ke dalam air hangat terlebih dahulu, dengan tujuan agar pembuluh vena ekor mengembang (dilatasi) sehingga mempermudah dalam pemberian obat atau sediaan.

Ekor kemudian dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 70% atau xylol dan obat atau sediaan dapat disuntikkan pada vena ekor (vena lateral). Namun ada

pendapat yang menyebutkan bahwa, untuk tikus, pemberian sediaan atau obat secara intravena lebih mudah melalui vena penis daripada vena ekor. Sementara itu pada kelinci, obat atau sediaan dapat disuntikkan pada bagian vena marginalis telinga setelah terlebih dahulu dilakukan pencukuran rambut telinga. Ukuran syringe dalam pemberian obat atau sediaan dapat menggunakan 1 mL dan jarum suntik (needle) ukuran 24G.



Gambar 37. Ukuran jarum suntik dalam Gauge

D. Intraperitoneal

Teknik intraperitoneal sering dilakukan mencit. Dengan menggunakan teknik ini, mencit dipegang dengan cara yang diuraikan di bab sebelumnya. Saat penyuntikkan berlangsung posisi kepala hewan uji harus lebih rendah dari bagian abdomen. Cara tersebut dapat dilakukan dengan teknik menunggingkan hewan uji. Jarum suntik kemudian disuntikkan

dengan membentuk sudut 46 derajat dengan abdomen, sementara posisi jarum agak menepi dari garis tengah agar tidak menusuk organ dalam seperti hepar.

E. Intramuskular

Teknik pemberian obat dengan cara intramuskular (IM) merupakan teknik pemberian sediaan atau obat melalui jaringan otot, umumnya di otot paha. Kecepatan dan kelengkapan adsorpsi sediaan atau obat dipengaruhi oleh kelarutan obat dalam air. Absorpsi lebih cepat terjadi di otot deltoid atau vastus lateralis daripada di bagian gluteus maksimus. Penyuntikan intramuskular juga dapat dilakukan pada mencit atau tikus pada bagian musculus yang tebal yaitu bicep femoris.

F. Volume maksimal injeksi

Volume pemberian obat maupun sediaan, sudah seharusnya juga dipertimbangkan untuk mencit. Volume pemberian tidak boleh melebihi dari batas maksimal yang ditetapkan. Berikut ini batas-batas maksimal pemberian obat atau sediaan (dalam mL) dengan berbagai metode pada beberapa hewan uji salah satunya untuk mencit.

Tabel 10. Jumlah maksimum volume (mL) pemberian obat atau simplisia pada hewan uji dan beberapa metode pemberian.

pemberian	Jenis hewan (berat badan)			
	Mencit	Tikus	Kelinci	Marmot
po	1	5	20	10
sc	0.5	2	3	3
iv	0.5	1	5-10	2
	0.05	0.1	0.5	0.2
ip	1	3	10	3

Keterangan: po = peroral; sc = subcutan; iv = intravena; im = intramuscular; ip = intraperitoneal.

Perhitungan volume administrasi obat (VAO)

Dalam pemberian obat atau simplisia ke dalam tubuh hewan, perlu memperhitungan berat dari hewan uji, konsentrasi obat atau sediaan yang diberikan dan dosis (mg/kg berat badan hewan uji) pemberian pemberian obat. Ketiga faktor tersebut berguna untuk menentukan volume administrasi obat (VOA).

Berat badan hewan uji seperti mencit sebaiknya ada dikisaran 17-25 g; tikus 150-200 g dan kelinci 15-20 kg. Sementara itu untuk perhitungan volume administrasi obat mengikuti rumus:

$$VOA = \frac{\text{Dosis (mg/kg bb)} \times \text{bb hewan uji (kg)}}{\text{Konsentrasi obat (mg/mL)}}$$

Berikut ini adalah contoh perhitungan penentuan volume administrasi obat. Misal diketahui:

- a. berat badan mencit 20 g = 0.02 kg
- b. dosis obat = 100 mg/kg bb
- c. Konsentrasi obat 10 mg/mL

$$\text{VAO} = ?$$

Dengan menggunakan rumus VAO:

$$\text{VAO} = \frac{\text{Dosis (mg/kg bb)} \times \text{bb hewan uji (kg)}}{\text{Konsentrasi obat (mg/mL)}}$$

$$\text{VAO} = \frac{100 \text{ (mg/kg bb)} \times 0.02 \text{ (kg)}}{10 \text{ (mg/mL)}}$$

$$\text{VAO} = 0.2 \text{ mL}$$

Untuk mencari konsentrasi obat atau sediaan yang digunakan maka rumus VAO diatas juga dapat digunakan, contoh:

- a. Berat badan mencit 20 g = 0.02 kg
- b. Dosis obat = 100 mg/kg bb
- c. VAO = standar 1% berat badan = 0.2
- d. Konsentrasi (C) = % ?

Penyelesaiannya adalah sebagai berikut:

$$C = \frac{\text{dosis (mg/kg bb)} \times \text{bb hewan uji (kg)}}{\text{VAO (\%)}}$$

$$C = \frac{100 \text{ (mg/kg bb)} \times 0.02 \text{ (kg)}}{0.2 \text{ (\%)}}$$

$$C = 10 \text{ mg/mL}$$

Jika suatu dosis untuk manusia sudah diketahui dan akan diujicobakan pada hewan uji (atau sebaliknya), maka perlu diketahui adanya faktor konversi. Berikut ini diberikan contoh perhitungan dosis dengan mempertimbangkan faktor konversi:

Misal diketahui:

- a. Dosis untuk manusia = 100 mg/kg bb
- b. Berat badan manusia 70 kg
- c. Dosis untuk hewan uji (contoh: mencit)?

Penyelesaian:

Dosis absolute =

dosis manusia (mg/kg bb) x bb manusia (kg)

$$= 100 \text{ mg/kg bb} \times 70 \text{ kg}$$

$$= 7000 \text{ mg/ 70 kg bb}$$

Faktor konversi dari tabel mencit ke manusia = 0.0026

Dosis untuk mencit =

Dosis absolute (mg/kg bb) x faktor konversi

$$= 7000 \text{ mg/kg bb} \times 0.0026$$

$$= 18.2 \text{ mg/20 g bb mencit}$$

$$= 910 \text{ mg/kg bb}$$

Jika sebaliknya ditanyakan konversi dari dosis mencit ke manusia maka contoh penyelesaiannya adalah sebagai berikut:

Misal diketahui:

- a. Dosis untuk mencit 200 mg/kg bb
- b. Berat badan mencit 20 g
- c. Dosis untuk manusia ?

Dosis absolute =

dosis mencit (mg/kg bb) x bb mencit (kg)

$$= 200 \text{ mg/kg bb} \times 0.02 \text{ kg}$$

$$= 4 \text{ mg/kg bb}$$

Faktor konversi dari tabel manusia ke mencit = 387.9

Dosis untuk manusia =

Dosis absolute (mg/kg bb) x faktor konversi

= 4mg/kg bb x 387.9

= 1551.6 mg/70 kg bb manusia

= 88.66 mg/kg bb manusia

Tabel 11. Perbandingan luas Permukaan Hewan percobaan untuk konversi

Hewan dan BB rata-rata	Mencit (20 g)	Tikus (200 g)	Marmut (400 g)	Kelinci (1,5 kg)	Kucing (2 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	29.7	27.8	29.7	387.9
Tikus (200 g)	0.14	1	1.74	3.33	4.2	56
Marmut (400 g)	0.08	0.57	1	2.25	2.4	31.5
Kelinci (1,5 kg)	0.04	0.25	0.44	1	1.06	14.2
Kucing (2 kg)	0.03	0.23	0.41	0.92	1	13
Manusia (70 kg)	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.013	1

Contoh perhitungan konversi dosis: Misal dosis likopen untuk manusia dewasa (70 kg) adalah 40 mg/hari. Dengan asumsi bahwa 100 gram tomat segar mengandung 3 mg likopen, maka dosis tomat untuk manusia dewasa adalah $40/3 \times 100$ gram = 1333 gram/hari. Dengan faktor konversi mencit adalah 0,0026, maka dosis untuk mencit Balb/c jantan dengan berat badan 20 gram adalah $0,0026 \times 1333$ gram/hari = 3,5 gram/hari (Zulfa 2006; Agarwal et al. 2008).

BAB 9 TEKNIK PENGAMBILAN DARAH

Darah merupakan jaringan ikat khusus yang tersusun atas komponen sel-sel darah dan plasma darah. Sel-sel darah terdiri atas sel darah merah (Eritrosit), sel darah putih (Leukosit) dan keping darah (Trombosit). Sementara plasma darah merupakan komponen darah yang terdiri atas protein pem-bekuan darah, mineral, elektrolit, antibodi serta air.

Darah berfungsi untuk mengedarkan oksigen dan sari makanan, membawa gas CO₂ ke paru-paru, mengembalikan sisa metabolisme ke ginjal untuk disekresikan, mendistribusikan hormon dan menjaga suhu tubuh. Secara spesifik, dapat diuraikan: fungsi eritrosit sebagai media transpor oksigen bersama dengan hemoglobin. Sementara leukosit berperan dalam pertahanan seluler dan humoral pada tubuh hewan. Trombosit sendiri berperan dalam proses penutupan luka yang terjadi.

Oleh karena fungsi pentingnya darah tersebut, maka parameter darah sering digunakan dalam berbagai penelitian-penelitian. Pengukuran hematologi hewan meliputi total eritrosit, leukosit, hemoglobin dan hematokrit.

Jumlah eritrosit pada hewan bervariasi tergantung kepada umur, jenis kelamin, kondisi fisiologi tubuh, variasi harian dan stres. Jumlah eritrosit sangat menentukan kondisi tubuh dari hewan uji. Jumlah leukosit

sama halnya dengan jumlah eritrosit, jumlahnya pada tiap hewan berbeda tergantung dari spesies, kondisi pakan, umur, kondisi musim dan ada tidaknya patologi.

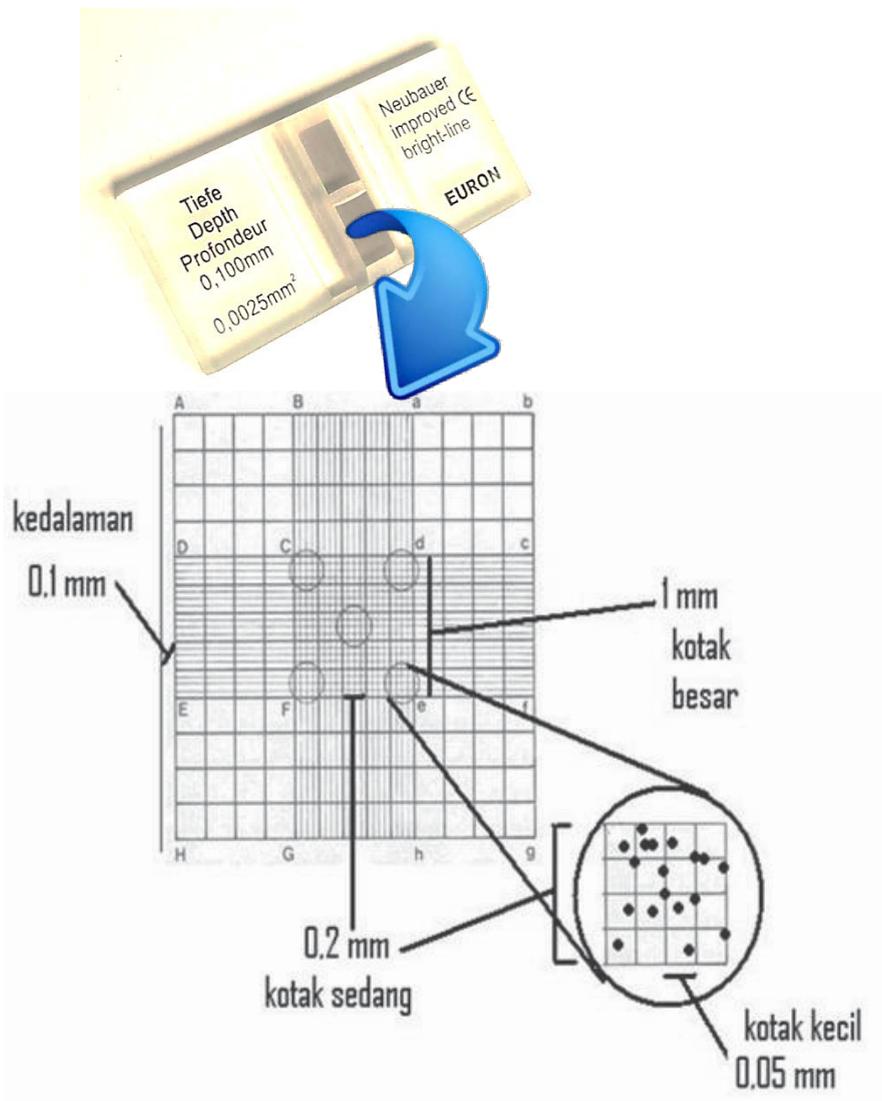
Selain jumlah eritrosit dan leukosit, beberapa parameter darah seperti kadar hemoglobin, Packed Cell Volume (PCV), Mean Corpuscular Volume (MCV) dan diferensial leukosit juga merupakan parameter penting untuk mengetahui kondisi fisiologi hewan uji.

Untuk dapat melakukan perhitungan darah yang benar baik eritrosit maupun eritrosit, tentu saja perlu diketahui teknik perhitungan darah. Berikut ini dijabarkan beberapa teknik perhitungan darah hewan uji yang sering dilakukan di laboratorium.

A. Hitung eritrosit

Hitung eritrosit dilakukan bertujuan untuk mengetahui jumlah total eritrosit dalam darah sampel hewan uji. Teknik menghitung eritrosit dapat dilakukan dengan bantuan bilik hitung thoma (Double improved Neabeaur). Metode yang digunakan sebagai berikut: sampel darah mencit/ikan atau ayam dihisap dengan pipet thoma (bertanda merah) untuk eritrosit hingga angka 1 dilanjutkan dengan penghisapan larutan hayem hingga angka 101. karet selang pipet dilepas dan kemudian tutup masing-masing ujungnya dengan ibu jari dan telunjuk, dikocok selama 2 menit, buang 1-2 tetes larutannya. Tetes berikutnya digunakan untuk perhitungan

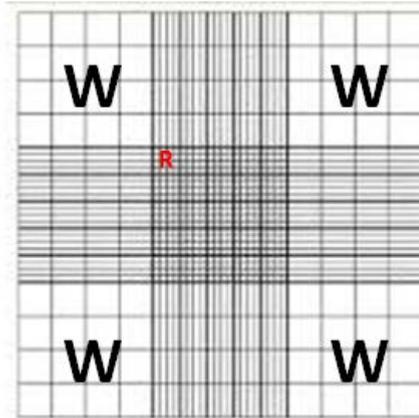
eritrosit.



Gambar 38. Bilik hitung thoma.
Ukuran-ukuran di bilik hitung thoma untuk perhitungan sel darah merah dan sel darah.



(A)



(B)

Gambar 39. Peralatan hidutng darah.

(A) Pipet eritrosit (merah) dan pipet leukosit (putih) (B) Layout perhitungn sel darah putih (W) dan Sel darah merah (R) di bilik hitung thoma

Jumlah eritrosit diketahui dari eritrosit yang berada di dalam 5 bilik hitung daerah R. Perhitungan secara zigzag. Untuk menghindari perhitungan yang kurang tepat, eritrosit yang ada di garis batas sebelah kiri dan atas suatu bilik kecil hitung dihitung sebagai eritrosit yang ada di dalam bilik kecil tersebut atau hitung semua eritrosit dalam 80 kotak kecil. Agar satu eritrosit tidak 2 kali terhitung, hitunglah sel-sel yang ada di dalam kotak dan sel yang menyinggung garis batas kiri dan batas atas, sel pada atau menyinggung garis batas kanan dan bawah tidak dihitung.

Jumlah eritrosit diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:
Perhitungan Jumlah eritrosit dalam 80 kotak kecil misal n sel faktor pengenceran: 200

Volume Kamar Hitung (80 kotak kecil) : $0,2 \text{ mm}^3$

maka jumlah eritrosit : $1/0,2 \times 200 \times 400$

$= 5 \times 200 \times n$

$= 10.000 \times n$ per μL darah

B. Hitung leukosit

Pembuatan preparat apusan darah untuk penghitungan leukosit dapat dibuat dengan cara metode apus darah dan difiksasi menggunakan methanol selama 3 menit dan dikeringanginkan. Setelah kering diwarnai dengan pewarna giemsa 20% selama 15 menit dan dikeringanginkan. Dilakukan kemudian pencucian dengan air mengalir. Hasil pembuatan preparat apusan tersebut dapat diamati dengan mikroskop pada perbesaran 10×100 .

Penghitungan leukosit dapat dilakukan dengan cara *cross sectioned* atau penghitungan leukosit yang dimulai dari bagian tepi ulasan darah di pengamatan dengan mikroskop hingga diperoleh 100 sel leukosit dan dinyatakan dalam persen (%). Hitung leukosit dengan kamar hitung atau bilik hitung juga dapat dilakukan dengan menggunakan metode dan rumus:

$$\text{Jumlah leukosit total (\%)} = \frac{\text{Komponen sel leukosit}}{100} \times 100\%$$

Darah hewan uji dihisap dengan pipet leukosit (bertanda putih) hingga angka 1. Dilanjutkan dengan menghisap larutan Turk hingga angka 11 (pengenceran $20 \times$). Lepaskan karet pipa dan tutup kedua ujung pipet dengan ibu jari dan telunjuk. Kocok-kocok kurang lebih 2 menit. Buang 1-

2 tetes, larutan yang ada siap untuk perhitungan leukosit dibilik hitung. Teteskan di bilik hitung. leukosit dihitung di bujur sangkar terluar (jumlah 4) jika dihitung total maka ada 64 bujur sangkar dengan sisi-sisi $1/4$ mm. Leukosit dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah leukosit per mm}^3 = L/64 \times 160 \times 10 = 25L$$

64 = Jumlah bujur sangkar total

1/160 = Volume

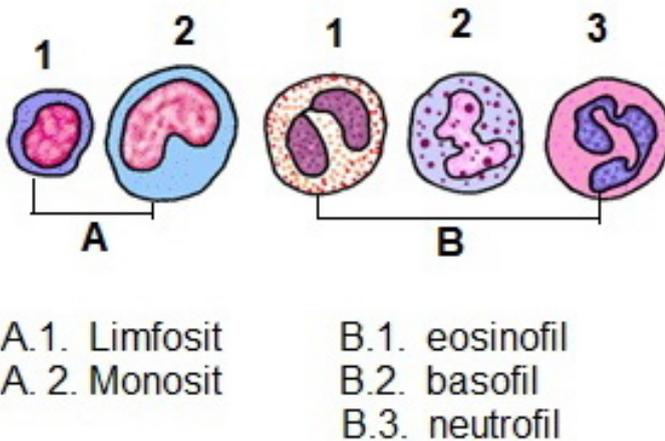
10 = Pengenceran

L = Jumlah leukosit terhitung

C. Hitung differensial leukosit

Hitung differensial leukosit bertujuan untuk mengetahui jenis dan jumlah macam leukosit dalam darah sampel hewan uji. menggunakan metode apusan darah. Darah dari hewan uji diteteskan di objek glass kemudian gelas objek lain ditempatkan dekat dengan tetesan darah dengan membentuk sudut 45^o dengan gelas objek pertama. Gelas objek kedua yang membentuk sudut 45^o kemudian digeser berlawanan arah sehingga darah tersebar merata ke seluruh permukaan objek gelas pertama. Diusahakan apusan yang terbentuk setipis mungkin sehingga sel-sel darah tidak bertumpuk dan memudahkan perhitungan. Apusan darah segera difiksasi dengan metanol selama 5 menit.

Dengan menggunakan pewarnaan Giemsa 20% (20-30 menit), gambaran leukosit agranulosit terdiri atas limfosit dan monosit. Limfosit memiliki inti sel besar berbentuk bulat, sementara monosit berukuran besar dengan bentuk tidak teratur. Gambaran leukosit granulosit terdiri atas neutrofil, eosinofil dan basofil. Neutrofil mempunyai ciri bentuk sel oval, sitoplasma bergranula dan inti sel eksentrik dengan 2 atau 3 lobus. Eosinofil, sel berbentuk bulat, inti sel terkadang eksentrik. Basofil, jarang didapat dengan menggunakan pewarnaan giemsa.



Gambar 40. Leukosit granuler dan agranuler

D. Hitung hemoglobin

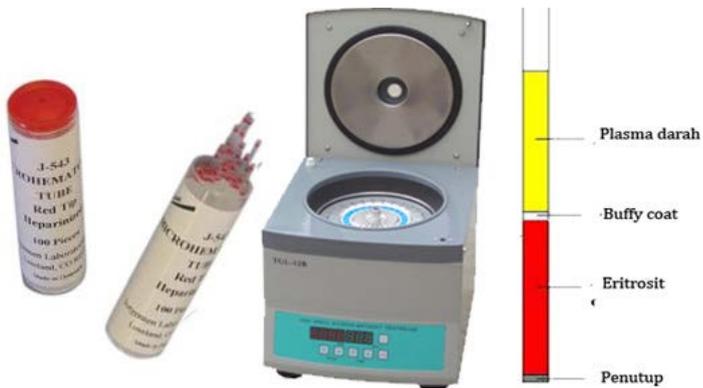
Nilai atau kadar hemoglobin mencit dapat ditentukan dengan metode hematin asam menggunakan alat hemoglobinometer. Cara mengukur kadar hemoglobin sebagai berikut: Tabung hemoglobin diisi dengan larutan HCl 0.1N

hingga tanda 2 gr %. Darah kemudian dihisap dengan pipet Sahli hingga tanda 20 mm³ dan diteteskan ke dalam tabung hemometer tanpa menimbulkan gelembung udara. Tunggu selama kurang lebih 10 menit agar terjadi reaksi pembentukan asam hematin. Campuran tersebut kemudian ditambahkan aquadest sambil diaduk dan warna yang terbentuk sama dengan warna standar coklat pada tabung standar. kadar hemoglobin dapat ditentukan dengan membaca angka pada miniskus dari larutan.

Penghitungan kadar hemoglobin dengan metode Sahli ini mudah dan praktis dilakukan namun mempunyai beberapa kelemahan, yaitu: hemometer tidak dapat dikalibrasi, kemampuan untuk membedakan warna tidak sama sehingga pembacaan terkadang tidak akurat, sumber cahaya mempengaruhi pembacaan hasil, jika terjadi kelelahan mata juga akan membuat bias data pengukuran dan warna gelas standard yang memudar akan mempengaruhi hasil.



Gambar 41. Haemometer Sahli



Gambar 42. Mikrohematokrit; Microcentrifuge

E. Hitung PCV

Penentuan PCV bertujuan untuk mengetahui volume total eritrosit per 100 mL darah dengan menggunakan metode hematokrit. Metode kerjanya sebagai berikut: pipet mikrohematokrit diisi dengan darah yang mengandung antikoagulan seperti heparin atau EDTA sebanyak 6/7 bagian pipet dan ujung masuknya darah ditutup/sumbat dengan menggunakan sabun atau lilin. Pipet hematokrit kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000rpm selama 5 menit. Setelah sentrifuge akan terbentuk lapisan

eritrosit, *buffy coat* dan plasma. Nilai hematokrit dibaca dengan *microhematokrit reader*.

F. Hitung Mean Corpuscular Volume (MCV)

Mean Corpuscular Volume atau disebut juga volume rata-rata eritrosit merupakan indikator ukuran eritrosit mulai dari ukuran kecil (Mikrositik), ukuran normal (Normositik) dan ukuran besar (Makrositik). Nilai MCV diperoleh dengan cara mengalikan hematokrit 10 kali kemudian dibagi dengan hitung eritrosit.

$MCV = (\text{Hematokrit} \times 10) : \text{Hitung eritrosit}$

Satuan fl = femtoliter

Misal hematokrit (PCV) = 35

Hitung eritrosit = 7.94

maka $MCV = (35 \times 10) / 7.94$

$MCV = 44.08 \text{ fl}$

BAB 10 TEKNIK EUTHANASIA, ANESTESI dan ANALGESIA

Euthanasia merupakan teknik membunuh hewan uji secara manusiawi, mudah mati tanpa kesakitan. Teknik tersebut mensyaratkan adanya aksi depresi pada saraf pusat sehingga memungkinkan kepekaan terhadap rasa sakit berkurang. Teknik-teknik euthanasia yang ada tersebut harus disesuaikan dengan tujuan penelitian dan jumlah hewan uji. Penggunaan teknik yang tidak tepat akan mempengaruhi hasil dari penelitian. Sebagai contoh, penelitian yang berhubungan dengan pengukuran plasma kortikosteron atau yang terkait (kortisol dan katekolamin), maka hewan uji tidak tepat bila dieuthanasia dengan teknik pemberian kloroform atau eter, karena kloroform dan eter akan menaikkan kortikosteron plasma. Namun, hal tersebut tidak terjadi apabila hewan uji di dekapitasi.

Sementara itu teknik euthanasia juga harus mempertimbangkan jumlah hewan uji. Hewan uji yang banyak tentunya akan tidak efektif jika dilakukan euthanasia secara individu. Euthanasia dapat dilakukan secara masal atau simultan dengan menggunakan eter atau metoksifluran.

Baik euthanasia secara individu maupun massal harus memenuhi kriteria-kriteria seperti: hewan tidak menunjukkan kepanikan dan kesakitan, kesadaran hewan uji harus segera hilang, dapat diulang euthanasianya berulang, murah dan

mudah, pengaruh ke lingkungan sekitar harus minim dan yang terakhir tentu saja tidak membahayakan bagi yang mengerjakan euthanasia.

Ada berbagai macam teknik euthanasia pada hewan uji yaitu: euthanasia secara fisik, euthanasia farmakologik non-inhalan, euthanasia dengan zat anestetik inhalan, euthanasia dengan gas non anestetik dan euthanasia dengan zat-zat transkuiliser (Isbagio 1992).

A. Euthanasia secara fisik

Teknik ini dapat digunakan apabila penggunaan kloroform atau eter tidak memungkinkan karena mengganggu hasil penelitian seperti dicontohkan di penjelasan sebelumnya. Euthanasia secara fisik dapat dibedakan menjadi beberapa cara yaitu: dislokasi leher (Cervical dislocation); pemberian aliran listrik (electrocution); pemenggalan leher (Decapitation) dan penembakan (Shooting).

B. Euthanasia farmakologik non-inhalan

Teknik ini menggunakan senyawa asam barbiturat serta derivatnya, campuran barbiturat, sodium pentobarbital atau magnesium sulfat. Senyawa-senyawa tersebut dapat diberikan dengan suntikan secara intravena, intrakardial namun harus dengan cara yang tepat mengenai jantung.

C. Euthanasia dengan zat anestetik inhalan

Teknik ini dapat dilakukan apabila teknik suntikan intravena sulit untuk dilakukan. Senyawa yang biasanya digunakan dalam teknik ini adalah: Kloroform, eter, halothane, metoksifluran dan nitrous oksida. Pemakaian teknik ini harus dengan ekstra hati-hati, penggunaan eter yang mudah terbakar dan meledak harus tepat dan dilakukan dalam tempat yang tertutup agar uap eter tidak mengganggu lingkungan dan peneliti sendiri. Jumlah eter yang digunakan juga harus diperhitungkan agar tidak terjadi pemborosan.

Penggunaan kloroform juga tidak disarankan apabila sampel organ yang akan diuji berkaitan dengan hati, ginjal, alat kelamin. Kloroform bersifat toksik terhadap organ-organ tersebut dan bersifat karsinogenik, sehingga peneliti juga harus hati-hati.

D. Euthanasia dengan gas non anestetik

Gas-gas yang tergolong non anestetik adalah CO; CO₂; N₂; sianida. Karbon monooksida dapat dibeli dipasaran dengan harga yang tidak mahal dan dapat dikemas dalam bentuk gas di dalam kontainer silinder maupun dalam "dry ice". Senyawa CO tidak mudah terbakar, tidak mudah meledak, bila digunakan dengan tepat dan hati-hati tidak akan membahayakan bagi penggunaannya. Pada umumnya CO ini digunakan untuk membius tikus, mencit, kelinci, namun jarang digunakan untuk hewan mamalia besar seperti kucing atau anjing. Pada kucing

dan anjing CO tidak mengakibatkan depresi pada sistem saraf pusat sehingga hewan masih merasakan kesakitan.

Meskipun penggunaan CO ini relatif aman, tindakan ekstra hati-hati dalam aplikasi karbon monoksida, karena gas ini amat beracun apabila terhirup banyak dan lama oleh peneliti. Ruangan yang digunakan untuk proses euthanasia dengan metode ini seharusnya dilengkapi dengan saluran pembuangan khusus, yaitu sebelum dibuang gas harus difiltrasi dan didinginkan. Pemakaian CO dengan konsentrasi kurang dari 2% akan berakibat pada haemoglobin di sel darah merah dan mengakibatkan paralise pada sentral respirasi dan jantung. Hal tersebut yang menyebabkan hewan uji segera mati. Pada umumnya kematian terjadi sekitar 3-5 menit setelah euthanasia dengan metode ini.

E. Euthanasia dengan zat-zat transkuiliser

Zat-zat yang tergolong dalam transkuiliser ini banyak dijumpai di pasaran. Zat yang termasuk dalam golongan ini adalah valium, librium, miltown, atarax, serax dan equamil. Valium dan transkuiliser lainnya pada dasarnya digunakan untuk menekan aktivitas sistem saraf pusat, mengurangi aktivitas simpatis, mereduksi kecepatan jantung, kecepatan pernafasan. Aplikasi zat transkuiliser dapat diberikan secara per oral, subkutan, intramuskuler maupun intravena. Kerugiannya adalah, harga yang masih relatif mahal, kurang efisien, pemberian dengan dosis tinggi menyebabkan efek

farmakologik. Aplikasi zat transkuiser ini sebaiknya digunakan hanya sebatas sebagai zat penenang pada praktek euthanasia untuk hewan kelinci, kucing dan anjing (Isbagio 1992).

Untuk mencit, teknik euthanasia fisik dapat dilakukan diantaranya dengan menggunakan cara diskolasi leher. Ekor mencit dipegang dan mencit ditempatkan pada permukaan kasar yang bisa dijangkaunya seperti kawat ram penutup kandangnya. Secara otomatis mencit akan meregangkan badannya. Saat mencit meregangkan badannya, pada tengkuk ditempatkan suatu penahan, misalnya pensil atau batang logam yang dipegang dengan tangan kiri. Secara cepat, ekor mencit atau tikus ditarik dengan tangan kanan dengan keras, sehingga lehernya akan terdislokasi.

Selain cara dislokasi leher, euthanasia dengan menggunakan bahan kimia antara lain dengan menggunakan eter atau pentobarbital-Na pada dosis yang mematikan. Namun, penggunaan eter atau kloroform harus mempertimbangkan tujuan percobaan jangan sampai mengganggu objek penelitian seperti diuraikan di bab sebelumnya.

Penggunaan Eter hanya digunakan untuk anestesi singkat. Caranya adalah eter diteteskan beberapa tetes ke kapas dan diletakkan dalam suatu wadah, kemudian hewan uji dimasukkan ke dalam wadah dan ditutup. Saat hewan telah kehilangan kesadaran, hewan dikeluarkan dan siap dibedah.

Penambahan selanjutnya diberikan dengan bantuan kapas yang dibasahi dengan obat tersebut. Sementara itu untuk anestesi yang lama dapat digunakan Pentobarbital natrium dan heksobarbital natrium. Dosis pentobarbital natrium adalah 45-60 mg/kg secara intraperitoneal dan 35 mg/kg secara intravena. Dosis heksobarbital natrium adalah 75 mg/kg (Intraperitoneal) dan 47 mg/kg (Intravena). Selain itu Uretan (etil karabamat) dapat diberikan pada dosis 1000-1250 mg/kg (Intraperitoneal) dalam bentuk larutan 25% dalam air. Berikut ini diberikan beberapa contoh bahan anestesi, volume dan lokasi pemberian.

Tabel 12. Bahan anestesi, volume serta lokasi pemberian.

Obat	Dosis	Rute pemberian
Kloral hidrat	400 mg/kg	ip
Ketamin Hidroklorida	22-44 mg/kg	im
Eter	-	Inhalasi
Barbiturate	35 mg/kg	Iv
(pentobarbital)	50 mg/kg	ip
(Tiopental)	25 mg/kg	Iv
	50 mg/kg	Ip
Halothane	2-5%	Inhalasi
Acepromazine	0.5-1 mg/kg	im
Diazepam	5 mg/kg	ip
	3-5 mg/kg	im
Ketamin	22-44 mg/kg	im
Yohimbe	0.5-1 mg/kg	iv
Propofol	12-26 mg/kg	iv

Keterangan:iv = intravena; im = intramuscular; ip = intraperitoneal.

F. Anestesia

Anestesia berasal dari bahasa Yunani yang mempunyai arti kehilangan kesadaran. Kehilangan kesadaran ini bersifat reversibel atau dapat kembali kesadaran. Kehilangan

kesadaran ini dapat meliputi keseluruhan tubuh atau bagian tertentu dari tubuh. Tujuan dari anestesia adalah untuk mengeliminasi persepsi rasa sakit dan memungkinkan hewan dimanipulasi dengan tujuan tertentu. Perlu diingat bahwa tidak ada anestesi yang 100% efektif dan aman absolut. Penggunaan teknik anestesia yang aman dan efektif tentu saja mempunyai dampak utama terhadap kondisi fisiologis hewan laboratorium.

Beberapa variabel di bawah ini perlu dipertimbangkan dalam pemilihan metode untuk anestesi.

1. Faktor hewan

Mencit sangat bervariasi dalam hal sensitivitasnya baik terhadap efek anestesi yang diinginkan maupun yang tidak diinginkan. Faktor umur, komposisi tubuh, status kesehatan, temperamen mencit, dan jenis kelamin mungkin akan mempengaruhi respon anestesia dan mungkin juga akan terlihat bervariasi antar stok maupun strain.

2. Prosedur

Anestesia bervariasi dalam hal durasi efek dan tingkat analgesia yang diberikan. Untuk itu perlu dipertimbangkan jangka waktu pemberian sehingga mencit masih dalam keadaan teranestesi dan tingkat rasa sakit dapat diminimalisir.

3. Kondisi laboratorium

Proses anestesi harus dilakukan di lingkungan laboratorium. Peralatan anestesi yang digunakan, tenaga ahli yang melakukan anestesi, alat monitoring ketika proses anestesi

berlangsung harus menjadi bahan pertimbangan dalam melakukan anestesi di laboratorium. Apabila hal-hal tersebut tidak dapat terpenuhi, maka pilihan anestesi dapat diabaikan dan pilihan menggunakan obat anestesi dengan cara penyuntikkan dapat dilakukan.

4. Pasca anestesia

Kebanyakan obat-obatan yang digunakan dalam anestesi akan mempunyai efek pasca anestesia yang tidak diinginkan. Sebagai contoh penggunaan pentobarbital, obat tersebut mempunyai efek depresan yang lama terhadap respirasi, regulasi temperatur atau keduanya. Jika mencit tidak dapat dimonitor dan tetap hangat setelah penggunaan pentobarbital, tingkat kematian akan tinggi. Untuk itu perlu digunakan jenis obat lain yang lebih baik dalam pemulihan pasca anestesia.

Ada banyak obat dan metode yang dapat digunakan untuk anestesia pada mencit serta banyak cara kombinasi obat dan metode untuk meningkatkan keberhasilan anestesia. Beberapa jenis obat-obatan dan metode yang sering digunakan ditabulasikan di tabel berikut ini:

Tabel 13. Jenis obat dan metode anestesia

Senyawa anestesia	Dosis	Rute administrasi
Inhalan anestesia (Halothane, Isoflurane, Methoxyfluran, Ether)	1-4%	Inhalasi
Pentobarbital	50-90 mg/kg (Dilarutkan dalam 1:9 larutan saline steril)	IP
Thiopental	25-50 mg/kg	IP

ETMU	80 mg/kg	IP
Ketamine 1 xylazine	100 mg/kg (Ketamine) 1 10 mg/kg (Xylazine)	IP atau IM
Ketamine 1 xylazine 1 Acepromazine	30 mg/kg (Ketamine) 1 5 mg/kg (Xylazine) 1 1 mg/kg (Acepromazine)	IP atau IM
Ketamine 1 medetomidine	75 mg/kg (Ketamine) 1 1mg/kg (Medetomidine)	IP
Tiletamine/Zolazepam	80-100 mg/kg	IP
Tribromoethanol	180-250 mg/kg	IP

1. Inhalant anestesia

Inhalan anestesia diberikan kepada hewan uji dalam bentuk gas atau uap. Secara umum, gas atau uap anestesia akan menyebabkan depresi pada transmisi impuls saraf di otak yang kemudian akan menghalangi transmisi impuls selanjutnya di dalam tubuh. Pada akhirnya tubuh kehilangan kontrol motorik, depresi serebral kortek, dan kehilangan kesadaran.

Inhalan anestesia yang sering digunakan pada mencit di antaranya adalah: halothane dan isoflurane. Dua jenis inhalan anestesia lainnya adalah methoxyflurane dan ether lebih jarang digunakan. Methoxyflurane saat ini sudah tidak diproduksi secara komersial karena lebih banyak kerugian dalam penggunaannya. pemberian bahan-bahan inhalan anestesia tersebut dilakukan dengan cara penghirupan ke hewan uji, sedangkan halothane dan isoflurane dapat dengan aman digunakan dengan menggunakan alat tertentu saja yang disebut *specialized anesthetic vaporizers*. Alat tersebut dapat

mengatur konsentrasi anestesia di udara yang terhirup atau oksigen.

Proses inisiasi anestesi mencit dengan menggunakan gas anestesia pada umumnya dan menempatkan hewan uji di dalam ruangan induksi (Induction Chamber). Ruangan induksi ini merupakan ruangan kecil dengan dilengkapi saluran gas halothane atau isoflurane dengan konsentrasi tertentu dan disalurkan ke dalam ruangan induksi dari penguapan anestesia.

Sekali mencit dianestesi, kemudian dipindahkan dari ruangan induksi dan anestesia di jaga dengan menghantarkan gas melalui masker di muka hewan uji yang cocok dengan ukuran hidung mencit.

G. Analgesia

Analgesia merupakan teknik mengurangi rasa sakit. Pemberian analgesia harus mempertimbangkan rasa sakit yang mungkin timbul akibat operasi. Tanda-tanda rasa sakit pada mencit meliputi:

1. Penutupan kelopak mata sebagian atau seluruhnya
2. Perubahan respirasi, baik peningkatan maupun penurunan laju respirasi
3. Peningkatan atau penurunan gerakan vibrisal
4. Hipotermia
5. Dehidrasi dan penurunan berat badan
6. Gerakan yang tiba-tiba atau mencolok seperti berlarian
7. Mutilasi diri, menggigit, menggaruk-garuk
8. Ataksia

Berikut ini daftar analgesik yang dapat digunakan pada mencit, yaitu:

Analgesik	Dosis (mg kg ⁻¹)	Rute	Durasi (Jam)	efek
Morfin	2-10	IP/SC	2-4	
oxymorfin	0.1-0.3	SC	3-4	
Buprenorfin	1.5-2.5	SC	3-5	
Butorfanol	3-5	SC	1-2	
Flunixin meglumine	2.5	SC	12-24	
Aspirin	100-300	PO	Belum	dideterminasi
Asetaminofen	100-300 atau 1-2 mg mL ⁻¹ dalam air minum	PO	Belum	dideterminasi
Ibuprofen	7.5	PO	Belum	dideterminasi

Sumber: (Suckow et al. 2001)

BAB 11 MEMBEDAH MENCIT

Pembedahan atau disebut nekropsi merupakan salah satu prosedur untuk mendapatkan sampel organ atau jaringan suatu hewan uji. Setelah mencit dibius dengan salah satu teknik yang disebutkan di bab sebelumnya, maka mencit siap untuk dibedah. Hendaknya telah diketahui tujuan nekropsi, apakah untuk pemeriksaan bakteriologi, virologi, histopatologi atau immunohistopatologi.

Nekropsis atau disebut juga autopsi/obduksi tidak dapat mengungkapkan semua sebab-sebab penyakit atau sebab kejadian penyakit. Nekropsi sering dapat digunakan untuk mengidentifikasi proses penyakit infeksius, kejadian defisiensi nutrisi, keracunan, penyakit parasitik dan tumor. Untuk keperluan identifikasi, nekropsi akan lebih baik jika dipadukan dengan pemeriksaan lapangan untuk dapat menentukan penyebab masalah. Nekropsi atau dikenal juga sebagai pemeriksaan postmortem dapat dilakukan untuk menentukan penyebab penyakit dengan cara deskripsi penyayatan makroskopis dan tinjauan mikroskopis dari jaringan serta melakukan pemeriksaan serologis, mikrobiologis yang memadai.

Pada umumnya ada dua jenis nekropsi yaitu:

1. Seksi lengkap = setiap organ atau jaringan dibuka serta dilakukan pemeriksaan

2. Seksi non lengkap = Bila hewan sakit/mati karena penyakit yang sangat menular atau zoonis (Anthrax, AI, TBC dan hepatitis).

Nekropsi harus segera dilakukan sebelum mengalami autolisis atau kerusakan jaringan permanen. Nekropsi harus dilakukan 6-8 jam setelah kematian. Lewat dari itu, maka kemungkinan kerusakan jaringan atau organ sangat besar dan akan mengganggu identifikasi.

A. Perlengkapan dan Material

Perlengkapan dan material yang digunakan untuk nekropsi pada mencit meliputi:

1. Ruangan berventilasi dan dilengkapi dengan pembuangan gas formalin agar tidak meracuni orang yang melakukan nekropsi
2. Kacamata gelas atau goggles, untuk melindungi dari uap formalin ke mata. Terkadang dibutuhkan kacamata dengan pembesar untuk keperluan pembedahan mikro atau spesimen kecil.
3. Sarung tangan atau gloves, perlu disediakan untuk menghindari paparan spesimen, darah atau kontaminasi ke tangan, terutama kontak dengan kulit. Sarung tangan berbahan latex sering digunakan atau vinyl bagi yang alergi dengan latex. Ada kalanya diperlukan juga *hand lotion*.

4. Jas laboratorium atau seragam proteksi wajib dikenakan untuk melindungi kontak langsung kontaminan atau agensia fiksatif dengan kulit atau tubuh.
5. Papan bedah, bahan dari plastik cukup dapat digunakan, mudah dibersihkan dan dapat digunakan berulang.
6. Kertas pembersih (Paper towel) atau tissue untuk untuk meletakkan organ reproduksi atau integumen ketika akan dilakukan pemeriksaan organ mencit
7. Penggaris atau alat ukur sejenis yang berguna ketika dilakukan pemotretan dan memberitahukan skala dari spesimen. Perlu disediakan pula alat penimbang yang sudah terkalibrasi
8. Forcep
9. Gunting
10. Skalpel
11. Jarum suntik dan syringe
12. Larutan Fiksatif
13. Larutan Dekalsifikasi
14. Kontainer untuk spesimen

Berikut ini prosedur nekropsi yang dapat dilakukan pada hewan mencit:

B. Nekropsi umum

1. Siapkan alat bedah, kapas, alkohol 70%, nampan operasi bedah, gunakan sarung tangan serta tempat pembuangan.

2. Mencit yang telah dibius ditelentangkan pada meja operasi berupa nampan yang telah diberi parafin padat. Mencit dibuat terlentang dengan tujuan supaya tidak bergeser
3. Difiksasi telapak kaki depan dan belakang dengan menyematkan jarum pentul atau paku kecil.
4. Insisi atau penyayatan dimulai dari dinding abdomen, memotong kulit dan muskulusnya, irisan dilanjutkan ke sisi kanan dan kiri, terus ke arah cranial, pemotongan costae sehingga rongga thorax terbuka.
5. Pembedahan juga dapat dilakukan dengan cara dimulai dari dada secara melintang menggunakan gunting tumpul dengan posisi mata tumpul ke dalam. Tujuannya agar ujung tumpul tersebut tidak merusak organ dalam.
6. Di bawah leher digunting secara membujur hingga mendekati anus. Daerah didekat anus digunting secara melintang. Kulit dibuka secara perlahan.
7. Organ yang diperlukan siap untuk diambil dan diidentifikasi.
8. Organ dengan hati-hati di ambil, dipegang organ/jaringan dengan hati-hati ketika diambil. Gunakan scalpel dengan hati-hati ketika memisahkan jaringan atau organ
9. Setelah selesai, mencit dibuang di kantong plastik dan alat bedah dibersihkan.

C. Nekropsi histopatologi

Dua hal penting dalam melakukan prosedur nekropsi untuk pengambilan sampel histopatologi, yaitu: kualitas spesimen yang dijadikan bahan pemeriksaan histopatologi

akan lebih baik jika diperhatikan cara penyimpanannya dan apabila timbul keraguan maka potong sebagian dan simpan serta awetkan. Untuk itu beberapa hal berikut dapat dilakukan untuk menjamin kualitas spesimen:

1. Jaringan segar yang akan disimpan dalam formalin, berasal dari hewan yang baru saja dibius dan dibedah. Jaringan lebih dari 8 jam tanpa segera difiksasi mengakibatkan autolisis sel-selnya.
2. Setidaknya digunakan 10x volume buffer formalin 10% dari volume/besar jaringan yang diambil untuk pembuatan preparat histopatologi.
3. Gunakan kontainer atau wadah yang dapat terbuka lebar. Tempatkan wadah formalin ditempat yang tertutup rapat saat diperjalanan. Ingat bahwa formalin mudah menguap.
4. Perlu dihindari jaringan yang dibekukan dalam freezer baik sebelum dan sesudah difiksasi dalam formalin.
5. Jaringan sebaiknya hanya setebal $\frac{1}{4}$ inchi (0,5 cm).
6. Perlu dilakukan pemotongan organ hati, atau organ lain sesuai kebutuhan, pada satu sisi yang sama, kemudian difiksasi dengan pengawet (formalin 10%).
7. Semua meterial, harus diberi label yang jelas tentang : jenis organ/ jaringannya, tanggal pengambilan sampel, species hewannya, bahan fiksatif. Gunakan penanda yang tidak mudah luntur oleh air, misal menggunakan pensil.

Untuk organ seperti paru-paru, perlu teknik fiksasi tersendiri, yaitu inflasi. Paru-paru setelah diambil dari tubuh

mencit segera difiksasi dengan cara menyuntikkan (infus) bahan fiksatif dengan bantuan alat suntik. Tujuannya adalah agar tidak terjadi kolaps alveoli, jika terjadi kolaps maka akan mengakibatkan misinterpretasi, karena kerusakan pada tahap pemotongan preparat. Namun juga perlu diperhatikan bahwa penyuntikan bahan infus tidak boleh mengakibatkan overinflasi. Overinflasi akan mengakibatkan rupture dari dinding sel alveolar. Rupture tersebut akan mengakibatkan misinterpretasi karena susah dibedakan dengan emphysema. Sebagai catatan: gelembung-gelembung mungkin timbul setelah inflasi akibat adanya percampuran antara cairan fiksatif dengan sekret dari paru-paru. Inflasi ini dapat dilakukan juga tanpa memisahkan paru-paru dari organ lainnya (In situ).



Gambar 43. Teknik inflasi organ paru-paru mencit

BAB 12 SPERMATOZOA MENCIT

A. Spermatogenesis

Spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferus. satu siklus spermatogenesis mencit memerlukan waktu 35,5 hari atau spermatogenesis akan selesai menempuh 4 kali daur epitel seminiferus. Lama satu kali siklus epitel seminiferus pada mencit adalah 207 jam \pm 6,2 jam.

Spermatogenesis dibedakan menjadi beberapa tahap:

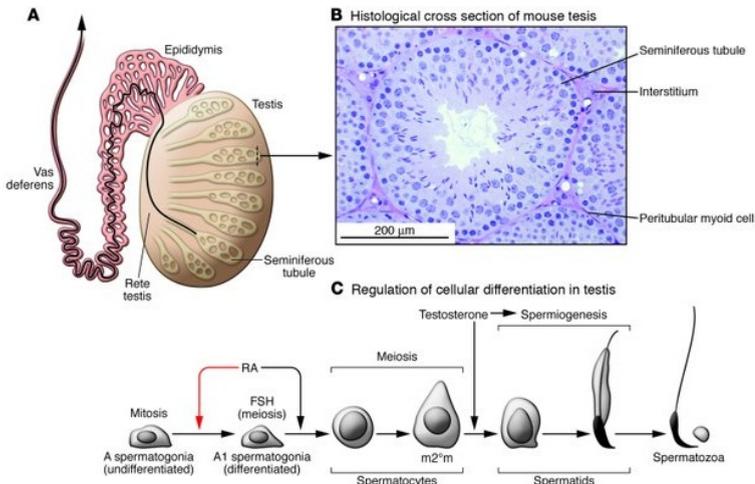
1. Tahap proliferasi,
2. Tahap pertumbuhan
3. Tahap pematangan T
4. Tahap transformasi/spermiogenesis.

Saat spermatogenesis, Follicle stimulating hormone (FSH) hormon yang berperan dalam menstimulasi kejadian awal spermatogenesis diantaranya proliferasi spermatogonia (Zhang, 2003). Fungsi FSH untuk menstimulasi pertumbuhan sel germinatif dalam tubulus seminiferus (Gofur, 2002).

Pada tahap proliferasi, spermatogonium mengalami mitosis menjadi spermatogonia tipe A selama tiga mitosis pertama, kemudian berlanjut menjadi spermatogonia tipe intermediet setelah pembelahan ke empat dan akhirnya menjadi spermatogonia tipe B setelah pembelahan ke lima (Handayani, 2001).

Selama tahap pertumbuhan spermatogonia mengalami penambahan volume. Spermatogonia tipe B kemudian menjadi

spermatisit I (primer). Tahap pematangan, spermatisit primer akan mengalami meiosis.



Gambar 44. Testis dan spermatogenesis pada mencit
 Sumber: <http://www.smb.wsu.edu/faculty-trainees-and-staff/faculty/michael-griswold/lab>

Selama pembelahan meiosis, FSH sangat berpengaruh terhadap kelangsungan pembelahan meiosis (Zhang, 2003). Pembelahan meiosis yang dialami oleh spermatisit primer dimulai dari meiosis I dilanjutkan ke meiosis II. Dari masing-masing fase pembelahan ini masih dibagi lagi ke dalam beberapa tahap, yaitu: profase, metafase, anafase dan telofase. Tahap profase I meiosis I merupakan tahap yang sangat panjang sehingga dikelompokkan lagi dalam lima stadia, yaitu: leptotene, zigotene, pakhitene, diplotene, dan diakinesis (Gardner, 1991). Menurut Suryo (1995) ciri dari masing-masing stadia sebagai berikut: (a) Leptotene memperlihatkan kromosom sebagai benang panjang, sehingga masing-masing

kromosom belum dapat dikenal; (b) Zigotene memperlihatkan bahwa kromosom-kromosom homolog berpasangan; (c) Pakhitene merupakan stadia yang paling lama dari profase I meiosis, benang-benang kromosom tampak semakin jelas karena adanya kontraksi dari kromosom sehingga kromosom tampak semakin menebal. Pada stadia ini berlangsung proses biologis yang sangat penting yaitu pindah silang (Crossing over). Pada stadia ini spermatosit primer mudah mengalami kerusakan dan degenerasi yang sangat luas (Johnson & Everitt, 1988); (d) Diplotene ditandai dengan memisahkannya kromatid-kromatid yang semula berpasangan membentuk bivalen; (e) Diakinesis yang merupakan stadia terakhir memperlihatkan kromosom-kromosom makin memendek dan kiasmata semakin jelas. Dari meiosis I akan dihasilkan dua sel anak spermatosit sekunder, masing-masing berisi satu set kromosom tunggal.

Pada meiosis II, terjadi pembentukan spermatid yang berasal dari spermatosit sekunder. Pada meiosis II ini masing-masing kromosom yang berada pada daerah ekuatorial hanya terdiri dari dua kromatid yang bersatu di sentromernya. Sentromer kemudian akan terbelah dan masing-masing kromatid akan bergerak menuju ke kutub yang berlawanan. Hasil dua kali pembelahan, akan terbentuk empat sel anak (Gofur, 2002). Pada tahap transformasi/spermiogenesis, spermatid mengalami serangkaian perubahan pada nukleus dan sitoplasma. Spermatid mengalami perubahan bentuk

menjadi spermatozoa yang memiliki kepala, leher dan ekor. Handayani (2001) dan Gofur (2002) menjelaskan bahwa transformasi spermatid menjadi spermatozoa dibedakan menjadi empat fase, yaitu: (1) fase golgi, dimana pada fase ini aparatus golgi dari spermatid membentuk granula yang kaya glikoprotein yaitu granula akrosom; (2) fase tutup dicirikan dengan granula akrosom tumbuh dan menutupi permukaan inti membentuk suatu tutup, pada saat itu membran inti kehilangan pori-pori, kedua sentriol menuju ke tempat yang berlawanan pada membran inti dan flagelum tumbuh dari distal sentriol, dari proksimal sentriol dibentuk leher yang mengikatkan ekor ke inti; (3) fase akrosom memperlihatkan inti mulai memanjang dan sitoplasma berpindah tempat maju ke daerah flagelum yang sedang berkembang; (4) fase pematangan ditunjukkan dengan inti memanjang dan kromatin berkondensasi di bawah tudung akrosom, membentuk inti yang spesies spesifik dan kehilangan membran inti dan nukleoplasma, aparatus golgi selesai membentuk tudung akrosom dan mulai berubah bentuk. Selama tahap transformasi/spermiogenesis testosteron sangat diperlukan terutama untuk menjaga supaya spermiogenesis berlangsung dengan sempurna (Zhang, 2003). Sekresi testosteron oleh sel-sel Leydig merupakan akibat dari aktivitas LH. Dalam hal ini LH menstimulasi aktivitas adenil siklase sehingga meningkatkan cAMP intraseluler. Kenaikan cAMP menyebabkan terjadinya fosforilasi protein intraseluler oleh aktivasi protein kinase,

yang akan mengubah pregnenolon menjadi testosteron (Handayani, 2001). Menurut Rugh (1968), spermatozoa mencit terdiri dari bagian kepala, bagian tengah dan ekor. Kepala mempunyai kait dengan panjang kira-kira 0,008 mm, bagian tengah pendek dan ekor sangat panjang (rata-rata 0,1226 mm). Pada kepala terdapat akrosom yang mengandung enzim hyluronidase yang berfungsi pada saat fertilisasi. Di dalam kepala terdapat inti. Pada bagian tengah terdapat mitokondria, aparatus golgi dan dua sentriol. Ekor menyerupai bentukan flagelum dan digunakan untuk pergerakan terutama pada saat berada dalam alat kelamin betina. Morfologi spermatozoa digambarkan sebagai berikut:

Kemampuan bereproduksi dari hewan jantan dapat ditentukan oleh kualitas dan kuantitas semen yang dihasilkan. Produksi semen yang tinggi dinyatakan dengan volume semen yang tinggi dan konsentrasi spermatozoa yang tinggi pula. Sedangkan kualitas semen yang baik dapat dilihat dari persentase spermatozoa yang normal dan motilitasnya (Hardjopranoto, 1995). Albert dan Roussel (1983) menyebutkan bahwa konsentrasi sperma pada epididimis dari mencit berumur 70 hari atau lebih, sebanyak $\geq 8,11 \pm 2,7$ juta/ml, dengan jumlah sperma normal $\geq 5,74 \pm 8,9\%$ dan jumlah sperma yang abnormal $6,6 \pm 2,6\%$. Sperma abnormal akan menurunkan fertilitas jantan. Beberapa abnormalitas tertentu dari sperma diketahui ada yang bersifat genetik (Nalbandov, 1990).

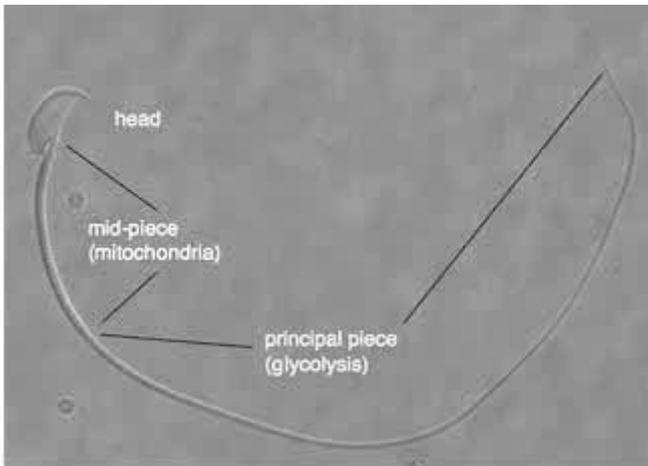
Abnormalitas pada sperma dapat terjadi pada kepala, leher dan ekor. Toelihere (1985) mengklasifikasikan abnormalitas pada sperma dalam abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi karena gangguan spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi selama spermatozoa menyelesaikan maturasi di epididimis. Yatim (1982) juga mengungkapkan bahwa abnormalitas sperma disebabkan faktor hormonal, nutrisi, obat, akibat radiasi, atau oleh penyakit. Kekurangan hormon, misalnya rendahnya kadar testosteron yang diproduksi sel Leydig dapat menghambat spermatogenesis dan dapat mengganggu maturasi sperma di dalam epididimis.

Spermatozoa mencit sering digunakan sebagai objek penelitian yang berkaitan dengan tingkat fertilitas. Berbagai bahan alam, bahan kimia, paparan lingkungan dan kadar atau level tertentu diterapkan ke mencit untuk dilihat keterkaitannya dengan tingkat fertilitas dengan melihat kualitas dan kuantitas spermatozoa.

Parameter kualitas dan kuantitas spermatozoa mencit merupakan salah satu uji untuk mengetahui tingkat fertilitas mencit jantan. Teknik menghitung spermatozoa mencit relatif mudah dilakukan. Berikut ini merupakan langkah-langkah menghitung spermatozoa mencit.

Lakukan dislokasi leher pada mencit yang yang digunakan untuk percobaan. letakkan mencit tersebut di

tempat pembedahan untuk pengambilan organ cauda epididimis. Setelah bagian epididimis diambil, segera organ tersebut dibersihkan dengan menggunakan phosphat buffer saline (PBS; Ca^{2+} dan Mg^{2+} free). Larutan PBS terdiri atas: 140 mM NaCl, 3mM KCl, 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.4. Larutan PBS ini dapat diganti dengan larutan NaCl 0.9% dengan suhu 37-40°C. Pemberian NaCl ini memberikan sifat penyangga, bersifat isotonis, mempertahankan pH semen.



Gambar 45. Morfologi normal spermatozoa mencit

Suspensi spermatozoa dikeluarkan dari organ cauda epididimis dengan cara disemprot dengan bantuan syringe, kemudian diencerkan dengan 2 mL PBS dan dihomogenkan. Campuran spermatozoa dengan PBS ini kemudian dapat digunakan untuk perhitungan konsentrasi spermatozoa, motilitas spermatozoa dan pengamatan morfologi spermatozoa.

Cara lain adalah: spermatozoa berasal dari bagian kurang lebih 1 cm dari bawah caput epididimis. Bagian tersebut dijepit, kemudian dipotong. Potongan tersebut kemudian dipencet untuk mengeluarkan cairan semen, tampung menggunakan cawan petri dan ditetesi NaCL 0.9% sebanyak 2 tetes. Aduk hingga homogen dan sesegera mungkin dilakukan pengamatan.

B. Konsentrasi sperma

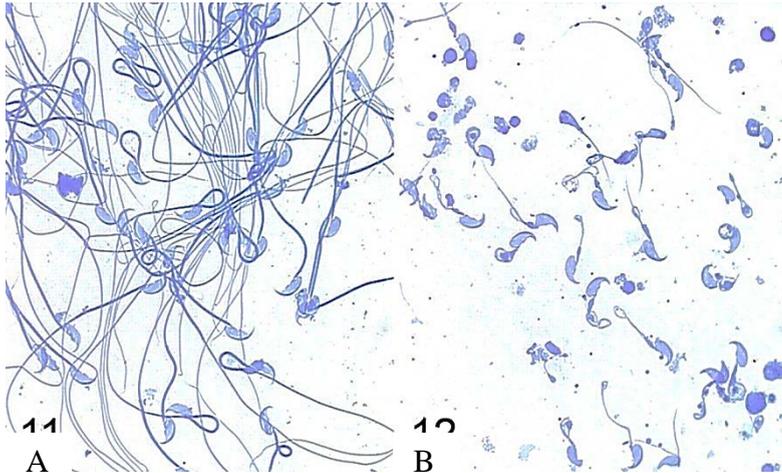
Suspensi sperma yang telah disiapkan dihisap dengan menggunakan pipet leukosit hingga tanda 1.0. Kemudian penghisapan dilanjutkan namun dengan larutan PBS hingga tanda 1.1. Homogenkan dengan cara dikocok. Sebelum dilakukan perhitungan, beberapa tetes campuran tersebut dibuang beberapa tetes, agar yang terhitung adalah bagian sperma yang homogen dengan pelarutnya

Penghitungan konsentrasi sperma dapat dilakukan dengan bilik hitung Thoma dan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak bilik hitung (25 kotak) untuk tiap sampel, dan dihitung rata-ratanya. Hasil penghitungan merupakan konsentrasi sperma dalam 10-5 mL suspensi sperma.

Konsentrasi sperma (per mL) = $25/5 \times \text{pengenceran} \times N$

Keterangan:

$N = \text{jumlah sperma terhitung rata-rata/mm}^3$



Gambar 46. Jumlah spermatozoa mencit
 A: Spermatozoa *Ttll1*^{+/+} mencit morfologi normal. B: Spermatozoa *Ttll1*^{+/+} mencit terjadi pengurangan jumlah, falgella pendek dan bagian tengah menebal. Pewarnaan Coomassie blue. Sumber: (Vogel et al. 2010)

C. Motilitas dan kecepatan gerak spermatozoa

Motilitas dan kecepatan gerak maju spermatozoa merupakan tolok ukur tingkat fertilisasi. Motilitas spermatozoa memberikan gambaran spermatozoa dengan kondisi sehat. Motilitas spermatozoa merupakan daya gerak spermatozoa pada bagian ekor atau flagellum untuk dapat bergerak dan memudahkan spermatozoa menuju ovum. Spermatozoa yang motil dan bergerak aktif akan dapat bertemu dengan ovum dan memungkinkan terjadi fertilisasi.

Motilitas spermatozoa dapat dikelompokkan menjadi beberapa kriteria yaitu:

- € Kriteria A = spermatozoa dengan motilitas bergerak maju (progresif)

€ Kriteria B = spermatozoa dengan motilitas bergerak di tempat

Sifat motilitas spermatozoa lebih nampak ketika tercampur dengan sekret kelenjar aksesoris genital jantan. Sementara itu kecepatan motilitas spermatozoa tergantung dari beberapa faktor diantaranya adalah pergerakan ion-ion, transpor membran spermatozoa dan integritas membran spermatozoa. Keberadaan senyawa radikal bebas atau dikenal dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Radikal bebas tersebut akan menyebabkan stress oksidatif, merusak membran mitokondria dan menurunkan motilitas serta kecepatan gerak spermatozoa. Keberadaan ROS juga akan menghambat reaksi akrosom serta kerusakan ekor spermatozoa sehingga motilitas dan kecepatan gerak maju terganggu.

Adanya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa juga berdampak pada penurunan permeabilitas membran untuk ion-ion spesifik. Hasil peroksidasi lipid dengan kadar yang tinggi akan menyebabkan gejala toksisitas pada membran sel. Oleh karena itu pengamatan motilitas dan gerak maju yang dilakukan dengan menggunakan micropipet sering dilakukan.

Prosedur pengambilan cairan sperma untuk perhitungan motilitas dan kecepatan gerak maju spermatozoa dapat dilakukan seperti metode sebelumnya. Spermatozoa dapat diambil dari bagian cauda epididimis atau pangkal vas deferens. Bagian yang diambil tersebut dapat diletakkan pada cawan petri dan dicacah dengan gunting bedah kecil serta

dilakukan pengenceran dengan garam fisiologis sebanyak 1 mL.

Motilitas sperma dilakukan dengan cara meneteskan suspensi sperma ke bilik hitung hemositometer Neubeaur. Dari 100 spermatozoa yang teramati dengan mikroskop pada perbesaran 400x, dihitung persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas baik (progresif). Proses penghitungan dilakukan dengan bantuan hand counter.

Pengamatan kecepatan gerak maju spermatozoa dapat dilakukan dengan cara meneteskan suspensi sperma yang telah dibuat pada bilik hitung hemositometer Neaubeaur. Kecepatan gerak maju spermatozoa diukur dengan menggunakan bantuan stopwatch. Waktu yang dibutuhkan untuk melintasi dua sisi bujursangkar kecil dari bilik hitung hemositometer dicatat sebagai t (Waktu) dan jarak antar sisi bujursangkar satu dengan yang berikutnya dicatat sebagai s (Jarak). Dari data tersebut dapat diketahui kecepatan progresif spermatozoa dengan rumus $V = s/t$. Kecepatan gerak progresif (V) dinyatakan dengan satuan $\mu\text{m}/\text{detik}$.

Kecepatan gerak spermatozoa dipengaruhi oleh bagian penting spermatozoa yaitu bagian leher. Di bagian tersebut banyak dijumpai adanya mitkondria. Mitokondria sebagai “dapur energi” bagi spermatozoa dalam melakukan gerak dengan molekul ATP.

Gerakan mengayuh ekor spermatozoa tersebut melibatkan dinein yaitu makromolekul protein aksonema ekor

spermatozoa. Di bagian dinein tersebut dijumpai aktivitas enzim ATP-ase yang tidak menghidrolisis ATP menjadi ADP dan fosfat dan energi. Energi yang dibebaskan tersebut yang digunakan untuk gerakan mengayuh spermatozoa.

D. Morfologi dan viabilitas spermatozoa

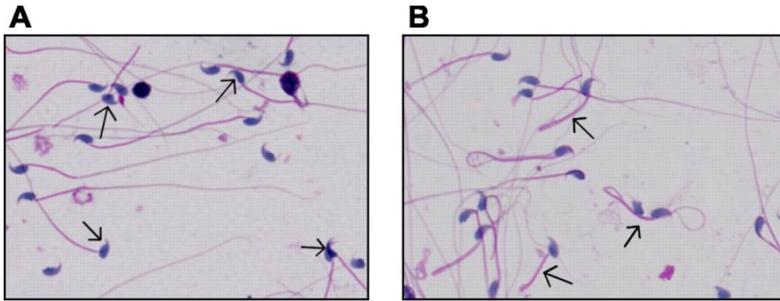
Morfologi spermatozoa merupakan salah satu tolok ukur penting juga untuk mengetahui tingkat fertilitas individu jantan. Spermatozoa yang mempunyai morfologi abnormal tidak dapat membuahi ovum. Persentase $\leq 20\%$ spermatozoa abnormal dinilai masih fertil, jika melebihi 20% maka berpotensi untuk terjadi infertilitas.

Abnormalitas spermatozoa dapat terjadi karena adanya gangguan dalam spermatogenesis. Abnormalitas spermatozoa dikelompokkan dalam abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi karena adanya gangguan spermatogenesis di tubulus seminiferus sedangkan abnormalitas sekunder terjadi ketika spermatozoa telah meninggalkan tubulus seminiferus dan selama perjalanan menuju epididimis.

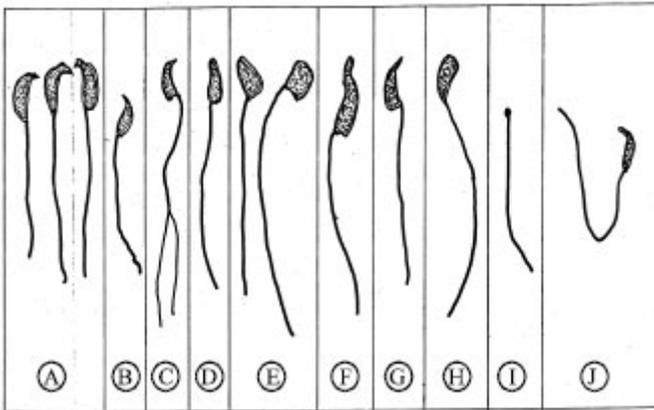
Abnormalitas primer pada spermatozoa mencit dapat berupa macrocephalic, yaitu ukuran kepala besar karena mengandung kromosom diploid; microcephalic, ukuran kepala kecil; kepala melebar atau bulat; kepala ganda; bagian tengah spermatozoa melipat; ekor putus atau terbelah. Abnormalitas sekunder spermatozoa dapat berupa kepala yang terpisah dari

ekornya. Abnormalitas sekunder dapat terjadi karena adanya gangguan proses pengangkutan DNA spermatozoa selama di dalam saluran reproduksi terutama di bagian epididimis. Abnormalitas tersier terjadi selama pengambilan semen saat pemeriksaan.

Dalam pengamatan morfologi spermatozoa, suspensi sperma yang telah dibuat ditetaskan ke gelas benda. Tetesan tersebut dibuat preparat apus dan diwarnai Giemsa 3%. Pewarna lain adalah Eosin-Y dan nigrosin 10%. Setelah diwarnai dan dikeringanginkan, kemudian diamati dengan bantuan mikroskop. Dari 100 spermatozoa, dihitung persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal dengan *hand counter*.



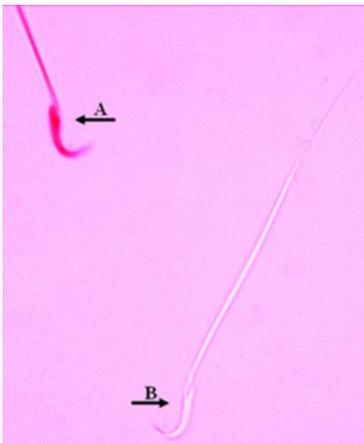
Gambar 47. Abnormalitas morfologi spermatozoa mencit.
 A: Abnormalitas kepala. B: Abnormalitas bagian ekor. Sumber:
 (Palmer et al. 2012).



Gambar 48. Abnormalitas kepala spermatozoa mencit
 Observasi abnormalitas kepala spermatozoa mencit. A: Spermatozoa berkepala normal ditandai dengan adanya kepala dengan kait (hook) bagian tengah dengan perlekatan rectanguler dan ekor tunggal; B: tanpa hook; C: ekor ganda; D:kait membulat; E:kepala tanpa bentuk; F: kait bengkok; G: kait dengan proyeksi yang salah; H: ekor melipat; I: kepala sangat kecil; J: kepala berbentuk seperti pisang.
 Sumber: (Otubanjo et al. 2007).

Pengamatan viabilitas atau jumlah spermatozoa yang hidup dapat menggunakan pewarnaan neutral red. Satu tetes suspensi sperma pada gelas benda di tambahkan pewarna

neutral red kemudian ditutup dengan cover glass dan diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x. Pada setiap bidang pandang (misal 5 bidang pandang) yang diamati di catat dari jumlah 100 spermatozoa yang hidup dan yang mati. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan warna terang karena spermatozoa tidak menyerap zat warna. Sebaliknya spermatozoa yang mati ditandai dengan adanya penyerapan warna merah dibagian kepala spermatozoa.



Gambar 49. Viabilitas spermatozoa menci

- A. Spermatozoa mati
 - B. Spermatozoa hidup
- Pewarnaan Eosin-Y (5% dalam larutan fisiologis)
 Sumber: Asadi, *et al* (2014)

Viabilitas spermatozoa yang teramati dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa}} \times 100\%$$

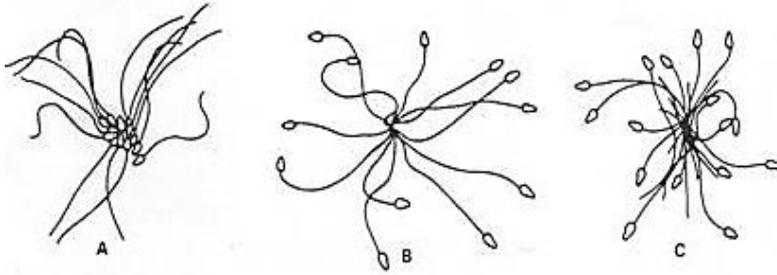
E. MAR Test

Uji *Mixed Antiglobulin Reaction* atau dikenal dengan MAR test merupakan uji langsung pada sampel sperma untuk

mengetahui sifat antibodi antisperma. Antibodi antisperma tersebut dapat ditemukan pada darah, plasma semen, cairan serviks, cairan tuba fallopii dan permukaan sperma itu sendiri, yang bersifat spesifik (Mazumdar, 1998; Lewis et al, 1998). Uji MAR ini spesifik menggunakan antibodi IgGs. Hasil positif lebih dari 50% spermatozoa mengalami penggumpalan, dan hal tersebut mengindikasikan adanya infertilitas.

Uji MAR secara spesifik digunakan untuk mengetahui adanya antibodi antisperma yang ditandai dengan penggumpalan spermatozoa setelah terpapar dengan lendir serviks. Penggumpalan Spermatozoa tersebut merupakan reaksi antara cairan serviks setelah diberikan cairan MAR test dengan IgGs. Penggumpalan yang terjadi pada MAR test diartikan telah terbentuknya antibodi anti sperma pada cairan serviks. Dalam hal ini, mencit betina mengalami intoleransi imun terhadap spermatozoa mencit jantan. Reaksi antibodi yang terdapat pada cairan serviks terhadap antigen yang masuk yaitu spermatozoa merupakan suatu hal yang sering terjadi sehingga spermatozoa tidak bisa mencapai tuba dan fertilisasi tidak terjadi.

Berdasarkan nomenklatur dari teknik pendeteksian antibodi anti sperma (ASA) dengan Uji MAR test, satu titik penggumpalan spermatozoa sudah menandakan adanya antibodi anti sperma. Penggumpalan Spermatozoa memiliki beberapa bentuk, yaitu *head-head*, *head-tail*, *tail-tail*, *mixed tail*.



Gambar 50. Tipe aglutinasi spermatozoa. A. Head-head; B. Head-tail; C. Mixed tail.

Sumber: <http://www.biogenetics.gr/en/male-infertility.htm>

Antibodi anti sperma dapat menyebabkan reaksi membran spermatozoa dengan cairan serviks dan dapat mencegah fertilisasi dengan cara menghambat spermatozoa melalui zona pellusida. Penggumpalan spermatozoa menunjukkan adanya antibodi antisperma pada mencit betina. Pada saat spermatozoa terpapar dengan cairan servik, maka antigen yang ada pada spermatozoa akan menyebabkan terbentuknya anti bodi pada cairan seviks tersebut.

Antibodi anti sperma adalah antibodi terhadap sperma di dalam tubuh, dapat terjadi pada jenis kelamin jantan maupun betina. Spermatozoa sendiri merupakan antigen atau benda asing bagi betina sama seperti benda asing lainnya atau disebut selfantigen karena diproduksi jauh setelah sistem imunologik berfungsi.

Pada betina, Antibodi anti sperma (ASA) mulai terbentuk saat terpapar oleh sperma. Terjadinya ASA merupakan salah satu faktor penyebab infertilitas saat sperma masuk ke saluran reproduksi betina, maka mulai terjadi reaksi penolakan. Ketika

antigen berada di saluran reproduksi, reaksi penolakan/respon pertama dilakukan oleh sel-sel phagosit dari sistem imun *innate*. Makrophag dan sel-sel *dendrite-like* berada di saluran reproduksi. Biasanya sangat sedikit neutrofil yang dijumpai di saluran reproduksi.

Pada betina yang sudah terpapar dengan spermatozoa baik melalui hubungan seksual secara normal atau cara lainnya akan menyebabkan munculnya respon imun dari tubuh betina terhadap spermatozoa dan responnya dapat dikatakan normal apabila tercapai

imunotolerans pada kadar tertentu dan respon dianggap tidak normal apabila imunotolerans mencapai pada kadar yang lebih tinggi sehingga menimbulkan infertilitas.

F. Test Hipoosmotic Swelling (HOS)

Pada dasarnya, membran semipermeable jika dibatasi oleh larutan yang berbeda tekanan osmotiknya, maka air akan mengalir melintasi membran dari larutan yang bersifat hipoosmotik menuju hiperosmotik. Kondisi tersebut menyebabkan banyaknya air pada larutan hiperosmotik bertambah dan tekanan osmotiknya mengecil, sedang banyaknya air pada larutan hipoosmotik berkurang serta tekanan osmotiknya membesar. kondisi tersebut akan terus berlangsung hingga besarnya tekanan osmotik antara kedua larutan tersebut sebanding.

Aplikasi teori osmosis untuk penentuan fertilitas spermatozoa telah ada tahun 1963 oleh Drevious. Drevious menyatakan bahwa ekor spermatozoa akan membengkok dan melingkar seperti spiral jika spermatozoa berada di cairan hipoosmotik. Pembengkokan terjadi akibat gangguan kontraksi relaksasi ekor oleh karena adanya aliran ion atau bahan yang berat molekulnya dari ekor ke dalam medium hipoosmotik.

Prinsip dasar tersebut di atas dapat dimanfaatkan untuk pengujian keutuhan spermatozoa pada mencit. Apabila ekor spermatozoa mengalami kerusakan maka proses keluar masuknya atau transport senyawa tidak dapat berlangsung secara normal sehingga akan menurunkan kualitas spermatozoa. Untuk menguji keutuhan ekor spermatozoa dapat dilakukan uji *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test) dengan berprinsip pada sifat teori osmosis di atas.

Kejadian spermatozoa membengkok dalam larutan hipoosmotic menunjukkan bahwa membran tersebut berfungsi. Untuk mengetahui kerusakan membran sel spermatozoa dapat dilakukan pengujian HOS. Uji HOS terhadap cairan semen mencit jantan pada cairan bersifat hypoosmotic. Apabila terdapat ekor spermatozoa melengkung (membengkok), hal tersebut menandakan bahwa membran selnya masih utuh. Namun apabila ekor nya lurus, menandakan bahwa membran selnya telah rusak dan karena tidak dapat mempertahankan keseimbangan osmotik.

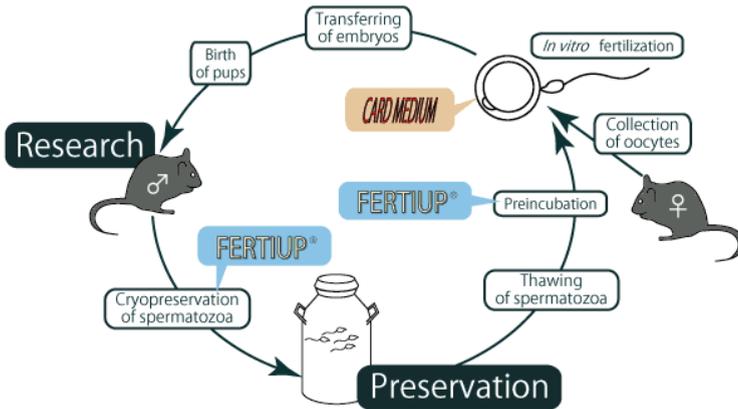
Pemeriksaan Hypoosmotic Swelling Test (HOS) Tes, dilakukan kepada sampel yang positif spermatozoanya mengalami Antibodi Antisperma (MAR test) yang ditandai dengan penggumpalan yang terjadi. Jika dalam sperma terkandung antibodi antisperma, nilai tes HOS biasanya rendah. Nilai normal tes HOS adalah 60%. Artinya, angka 1-40% menandakan adanya kerusakan membran masih alamiah. Makin rendah nilai tes HOS, makin besar kerusakan ekor sperma terjadi.

Berikut ini cara sederhana melakukan pengujian HOS pada sperma mencit:

1. Suspensikan 10 μ L sperma dengan air steril (1:5)
2. Inkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C
3. Persentase spermatozoa dengan ekor membengkak dan ekor lurus (HOS test) di amati dengan mikroskop pada perbesaran 400x

G. Cryopreservasi spermatozoa mencit

Cryopreservasi spermatozoa mencit merupakan teknik yang berguna dan efektif untuk penyimpanan sejumlah besar spermatozoa mencit transgen, mutasi yang direncanakan dan hasil induksi kimia. Dengan cryopreservasi spermatozoa ini, spermatozoa dapat dimanfaatkan kapan saja, lebih ekonomis dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama.



Gambar 51. Cryopreservasi dan In Vitro Fertilization
 Sumber: http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/detail/kyd_20110715.asp?entry_id=7791

Beberapa metode cryopreservasi spermatozoa mencit telah banyak dikembangkan. Berikut ini teknik cryopreservasi spermatozoa mencit (Glenister & Thornton 1998; Thornton et al. 1999).

Bahan:

1. Larutan Cryoprotectant (CPA)
2. 1.8 mL Nunc cryotubes
3. Rak Cryotube
4. Tabung eppendorf 1.5 mL beserta sentrifuganya
5. Kotak polistirenen dengan tutup untuk tempat menempatkan cairan nitrogen
6. Tabung untuk nitorgen cair
7. Inkubator CO₂ (37oC, 5% CO₂)
8. Blok panas 37°C
9. Mencit jantan dewasa setidaknya berumur 8 minggu (disarankan yang bukan setelah kawin)

Preparasi CPA:

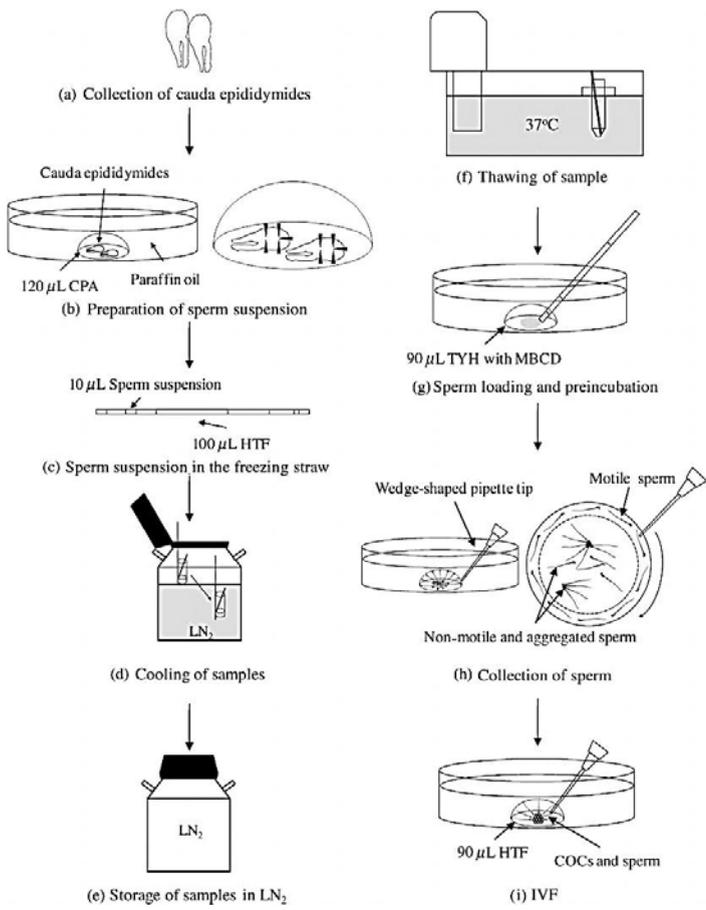
1. Tempatkan 9 mL air steril dalam tabung falcon 15 mL yang dilengkapi dengan tutup dan di ekuilibrasi pada suhu 60°C di waterbath.
2. Ditambahkan 1.8 g raffinosa dan larutkan dengan cara dibolak balik
3. Tambahkan 0.3 g susu skim dan dihomogenkan dengan cara dibolak balik
4. Tambahkan air steril hingga 10 mL jika perlu
5. Masukkan aliquot ke tabung eppendor dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit.
6. Buang supernatan dan saring dengan mikrofilter (0.2-0.45 μm) ke dalam cryotube atau tabung eppendorf.
7. Simpan pada suhu -20°C (1.1 mL aliquots)

Metode Cryopreservasi

1. Siapkan apparatus untuk pendinginan
2. Tempatkan platform di kotak polistirene, tempat ini juga mensupport rak cryotube
3. Tuangkan nitrogen cair secara hati-hati ke dalam kotak polistirene sehingga menutupi platform
4. tempatkan rak cryotube di atas platform sehingga dapat teruapi oleh nitrogen cair, diperlukan saat penyimpanan beku. namun dijaga jangan sampai ketinggiannya di atas platform
5. Thawing 1 aliquot larutan cryoprotectant untuk setiap mencit pejantan dan masukkan dalam inkubator dengan

suhu 37°C atau hot block. campur dengan cara inversi jika ada endapan

6. Pipet 1.1 mL CPA ke dalam Falcon kecil 35 mm ke dalam hot block 37°C.
7. Bedah Vas deferent dan cauda epididimis mencit dan bersihkan dari lemak dan darah. Akan lebih baik dilakukan pengamatan dengan mikroskop agar sisa lemak dan darah tidak terikut
8. Keluarkan sperma dengan hati-hati dari cauda dan keluarkan dari vas different tempatkan di petri
9. Aduk rata suspensi sperma tersebut dan tempatkan di inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 10 menit, biarkan sperma dalam petri kondisi agak dimiringkan
10. Dengan posisi masih dimiringkan, pastikan sisa epididimis dan vas defferent dari suspensi dikeluarkan dengan cara memisahkan ke sisi petri yang lain.
11. Aliquot 100 µL ke dalam tiap 10 cryotube (atau 200 µL aliquot dalam 5 cryotube). Tutup dengan rapat cryotube
12. Tempatkan cryotube ke dalam apparatus untuk pra pendinginan (Kotak polistirene) dan biarkan selama 10 menit
13. Pindahkan dari kotak polistirene dan ditempatkan di penyimpanan nitrogen cair hingga digunakan.
14. Hasil cryopreservasi ini biasanya dapat digunakan untuk percobaan in vitro fertilization (IVF)



Gambar 52. Teknik cryopreservasi spermatozoa menciit
 Sumber: Takeo, T. and Nakagata, N., 2010.

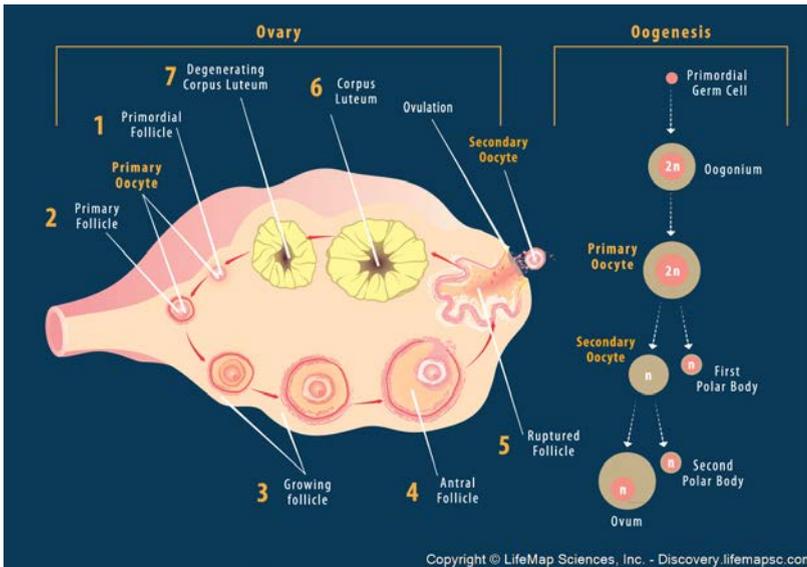
BAB 13 OVARIUM MENCIT

A. Oogenesis

Ovarium merupakan organ reproduksi utama pada betina, berjumlah sepasang dan terletak di dalam rongga perut. Organ tersebut berperan dalam menghasilkan sel telur (ovum) yang masak, produksi hormon progesteron yang berfungsi dalam memelihara masa kehamilan serta sekresi hormon estrogen untuk mempertahankan sifat sekunder dan membantu dalam oogenesis.

Oogenesis sendiri adalah proses pembentukan sel telur (ovum) di dalam ovarium. Ovum adalah sel telur pada betina. Oogenesis dimulai dengan pembentukan bakal sel-sel telur yang disebut *oogonia*. Oogenesis terjadi secara mitosis dan meiosis. Sel oogonia yang bersifat diploid membelah secara mitosis menghasilkan sel oogonia tambahan. Hasil pembelahan tersebut berupa dua sel haploid, satu sel yang besar disebut oosit sekunder dan yang satu sel berukuran lebih kecil yang disebut badan kutub primer.

Tahap selanjutnya, oosit sekunder dan badan kutub primer mengalami pembelahan meiosis II. Namun, pembelahan tersebut hanya dapat berlangsung jika terjadi fertilisasi. Oosit sekunder akan membelah menjadi dua sel, satu sel berukuran normal disebut ootid dan satu sel lagi berukuran lebih kecil disebut badan kutub (Badan polar) sekunder.



Gambar 53. Ovarium dan oogenesis

Sumber: <https://discovery.lifemapsc.com/library/images/oogenesis-in-ovary>

Ootid kemudian mengalami perkembangan lanjut menjadi ovum yang masak, sementara badan polar segera hancur.

B. Transplantasi ovarium menci

Transplantasi ovarium di subkapsula ginjal dilakukan pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya yaitu Mohamad et al. (2004). Secara ringkas, ginjal dikeluarkan, potongan ovarium yang telah disiapkan disisipkan di bawah kapsula. Ginjal kemudian kembali dimasukkan, dinding abdomen dan kulit dijahit, lalu diberi antibiotik.

Untuk memastikan apakah ovarium yang ditransplantasikan memiliki folikel yang berkembang atau tidak, maka dibuat sediaan histologi. Jaringan ovarium yang

dikoleksi difiksasi dengan larutan fiksatif larutan Bouin selama 24 jam. Setelah itu jaringan didehidrasi dalam alkohol, dijernihkan dalam xylol, dan ditanam dalam parafin. Jaringan disayat secara serial dengan ketebalan 5 μm . Preparat kemudian dideparafinisasi, rehidrasi, dan diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).

C. Vitrifikasi ovarium mencit

Vitrifikasi adalah sebuah metode pembekuan melalui proses pemadatan larutan tanpa pembentukan kristal es sebagai akibat dari dua hal yaitu: peningkatan viskositas dan penurunan suhu yang sangat cepat. Pada awalnya pembekuan ovarium pada tahun 1950-an menggunakan gliserol sebagai cryoprotectant, namun karena hasil kurang memuaskan. Penelitian lanjutan mengenai pembekuan ovarium baru muncul kembali di awal tahun 1990-an dengan dilaporkannya keberhasilan pembekuan ovarium pada mencit menggunakan cryoprotectant dimetil sulfoksida (DMSO). Kemudian penelitian menggunakan berbagai ovarium hewan telah berhasil dibekukan dengan metode konvensional, mulai dari ovarium mencit sampai manusia.

Namun, Penggunaan DMSO sebagai cryoprotectant untuk vitrifikasi ovarium belum juga menunjukkan hasil yang maksimal. Jika hanya DMSO dengan konsentrasi 30%, maka tidak ada ovarium yang berhasil tumbuh, tetapi jika digunakan ditambahkan ethylene glycol (EG) dengan konsentrasi masing-

masing 15%, maka sebagian ovarium berhasil bertahan hidup. Konsentrasi DMSO sebesar 30% yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan 10% yang digunakan pada pembekuan metode lambat, menunjukkan kemungkinan toksisitas pada penggunaan DMSO sebagai cryoprotectant pada proses vitrifikasi. Hal ini diperkuat dengan penurunan DMSO 15% yang digunakan bersamaan dengan EG 15% mampu menurunkan toksisitas DMSO dan menghasilkan ovarium tumbuh.

Penggunaan konsentrasi EG 30% dan waktu pemaparan 5 menit cukup memadai untuk vitrifikasi sel telur dan embrio mencit. Penggunaan konsentrasi yang lebih dari 40 % juga telah dilaporkan pada vitrifikasi embrio mencit. Selain itu, pemaparan yang lebih lama untuk jaringan ovarium telah dilakukan selama 5 menit, suhu kamar kemudian dilanjutkan 15 menit di suhu air es. Masuknya cryoprotectant EG atau DMSO ke dalam jaringan ovarium sebanyak 70-80% dari konsentrasi larutan yang digunakan dicapai setelah pemaparan selama 20-30 menit pada suhu 4°C atau 10 -20 menit pada suhu 37°C.

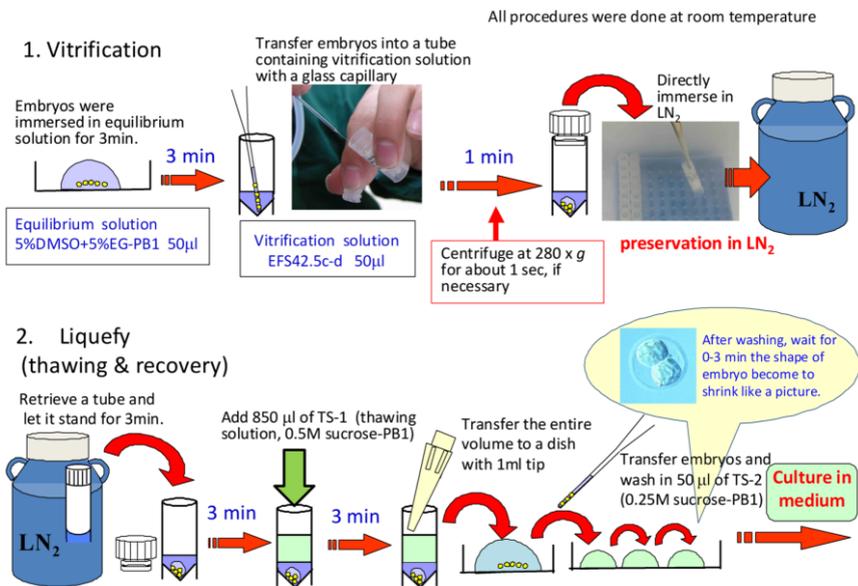
Etilen-glikol memiliki bobot molekul yang lebih kecil yaitu 62,07 dibandingkan dengan DMSO yaitu 78,13. Dengan berat molekul yang lebih kecil, EG dengan mudah masuk dan keluar sel atau jaringan selama proses equilibrasi dan pencairan kembali. Di samping itu EG memiliki beberapa sifat yang menguntungkan yaitu

1. Kemampuan mengikat air yang kuat
2. Mencegah peningkatan konsentrasi yang ekstrim
3. Menghindarkan terjadinya kristal es intraseluler, sehingga mengurangi kerusakan yang terjadi akibat proses vitrifikasi.

Berikut ini merupakan teknik vitrifikasi yang dapat dilakukan pada mencit:

1. Ovarium dikoleksi dengan cara ovariektomi melalui bedah punggung seperti yang dilaporkan Mohamad et al. (2003). Ovarium yang telah dikoleksi dibersihkan dari sisa bursa ovari, dicuci dalam NaCl fisiologis, dibelah dua dan disimpan di atas balok es sampai saat dilakukan vitrifikasi.
2. Larutan vitrifikasi yang digunakan adalah modified phosphate buffered saline (mPBS) yang mengandung serum fetus sapi (fetal bovine serum [FBS]) 20% dan cryoprotectant.
3. Cryoprotectant yang digunakan dapat berupa etilen glikol (EG) 30% atau campuran EG 15% + DMSO 15%. Ovarium dipaparkan secara berurutan dalam larutan mPBS + sukrosa 0,25 M; mPBS + sukrosa 0,5 M; mPBS + sukrosa 0,5 M + cryoprotectant 10%; dan mPBS + sukrosa 0,5 M + cryoprotectant 30% masing - masing selama lima menit.
4. Ovarium dikemas dalam straw 0.5 mL, dipaparkan pada uap nitrogen cair selama 10 detik dan langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair.

5. Ovarium dibiarkan di dalam nitrogen cair minimal selama 30 menit lalu dilakukan penghangatan (warming).
6. Straw diambil dari nitrogen cair, dibiarkan di udara selama 10 detik lalu dimasukkan ke dalam air dengan suhu 37°C sampai mencair.
7. Straw dipotong, ovarium dikeluarkan dan dimasukkan berturut-turut ke dalam larutan mPBS + sukrosa 0,5 M; mPBS + sukrosa 0,25 M; dan mPBS (3 kali) masing-masing selama lima menit.
8. Selanjutnya ovarium dapat ditransplantasikan ke subkapsular ginjal pada mencit yang sama (autotransplantasi).



Gambar 54. Vitrifikasi pada mencit
Sumber: (Mochida et al. 2013)

Penurunan viabilitas sel telur dapat disebabkan oleh beberapa faktor.

1. Konsentrasi cryoprotectant yang digunakan tidak memadai untuk mencegah pembentukan kristal es intra seluler (meskipun selama vitrifikasi tidak terdapat indikasi terbentuknya kristal es ekstra seluler) dan melindungi ovarium dari kerusakan selama proses pembekuan. Kristal es intra seluler secara mekanis dapat merusak organel sel, sehingga menyebabkan kematian sel.
2. Waktu pemaparan yang kurang lama sehingga cryoprotectant yang masuk (penetrasi) ke dalam jaringan ovarium tidak mencukupi.
3. Penggunaan kemasan straw 0.5 mL meningkatkan volume larutan dan barrier antara larutan dengan nitrogen cair sehingga mengurangi kecepatan penurunan suhu saat vitrifikasi dan kecepatan pencairan kembali saat pemanasan. Kecepatan penurunan suhu dan pencairan kembali saat pemanasan sangat mempengaruhi keberhasilan vitrifikasi. Pengurangan volume seperti pada teknik open pull straw (OPS) dan penghilangan barrier dari kemasan seperti pada solid surface vitrification (SSV) telah berhasil meningkatkan keberhasilan vitrifikasi sel telur atau embrio.

D. Superovulasi

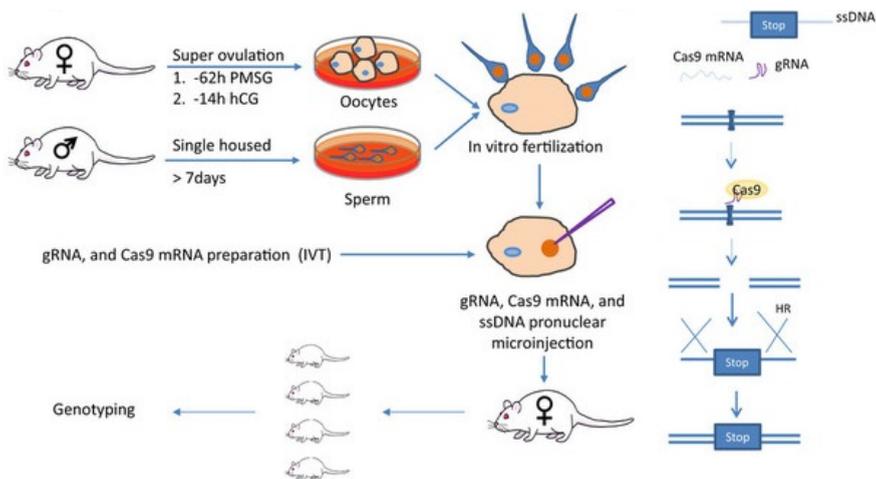
Mencit merupakan hewan populer yang digunakan sebagai hewan model dalam penelitian reproduksi dan perkembangan hewan. Untuk dapat memenuhi sampel percobaan, sejumlah besar

Superovulasi pada mencit dilakukan untuk memperbanyak jumlah anakan mencit dan digunakan untuk penelitian-penelitian yang terkait dengan embriologi.

Hasil dari superovulasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah strain dan usia. Hasil penelitian Zohreh et al (2010) menyebutkan bahwa jumlah oocyte yang diperoleh dari superovulasi berbeda signifikan hasilnya antara strain Balb/C dan NMRI. Sementara itu, superovulasi yang dilakukan pada mencit usia 20-32 hari (28.7 per superovulasi) hasilnya lebih bagus daripada mencit berusia 32-60 hari (11.3-14 per superovulasi) (Hoogenkamp & Lewing 1982).

Berikut ini cara superovulasi yang dapat dilakukan pada mencit dengan menggunakan berbagai senyawa penginduksi

1. Disiapkan mencit dengan strain tertentu yang akan digunakan untuk superovulasi
2. Mencit umur 2-3 bulan disuntik dengan penyuntikan hormon pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Folligon, Intervet) 5UI per ekor secara intraperitoneal (ip).
3. Setelah 48 jam kemudian dilanjutkan dengan penyuntikan hormon Human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon, Intervet) 5 UI per ekor secara intraperitoneal (ip)
4. Mencit superovulasi siap digunakan untuk berbagai penelitian terkait.



Gambar 55. Teknik superovulasi pada mencit

Berikut ini teknik superovulasi dan bahan penginduksi superovulasi lain yang dapat digunakan:

1. Mencit dengan strain tertentu diaklimatisasi dengan kondisi laboratoris.
2. Tiap mencit di superovulasi dengan bahan penginduksi superovulasi sejumlah 15 IU secara intraperitoneal pada pukul 2 siang
3. Bahan penginduksi superovulasi tersebut dapat berupa Human Postmenopausal Gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono Italy); Urofilitrop dalam FSH-HP (Metrodin, Serono Italy); atau Synthetic Gonadotropin Releasing Hormone-GnRH, Fertagyl, Intervet, Holland)
4. Setelah 16-18 jam ,kemudian lakukan penyuntikan Chorionic gonadotropin (Chorulon, Intervet, Holland) sebanyak 15 IU, intraperitoneal pada pukul 4 sore.

5. Oosit kemudian dikoleksi dari oviduct dengan cara pembilasan dengan hyaluronidase (8 IU/mL) selama 0.5-1 menit untuk menghilangkan sel-sel kumulus.
6. Oosit kemudian dibilas dengan medium percobaan yang digunakan dan siap diaplikasikan dalam percobaan.

BAB 14 EMBRIOLOGI MENCIT

Mencit sering kali digunakan untuk penelitian yang berkaitan dengan embriologi dan secara luas digunakan sebagai model perkembangan embrio bagi mamalia secara umum. Di samping masa kehamilannya cepat 18-21 hari, mencit punya anakan yang banyak sekitar 6-12 ekor.

Berikut ini merupakan gambaran tahap perkembangan embrio mencit dimulai dari zygot hingga kelahiran. Untuk memudahkan mempelajari perkembangan embrio mencit, penjelasan berikut diberikan dalam tahapan-tahapan tiap minggu (3 minggu).

A. Perkembangan awal embrio mencit

Minggu 1

Hari ke-1

Proses terjadinya embrio diawali dengan tahapan zygot yang merupakan hasil fertilisasi. Zygot berupa satu sel, kemudian akan membelah menjadi 2-4 sel. Zona pelusida masih dijumpai. Pembelahan pertama kali terjadi di awal 24 jam pertama. Umur embrio = 1 dpc (Days post coitum), atau pada kisaran 1-2.5 dpc. Morula (tahapan awal morula nampak kompak) dengan 4-16 sel.

Hari ke-2

Morula nampak di oviduct bagian utero-tubal junction. Umur embrio = 2 dpc (kisaran 1-3.5 dpc). Blastosit dengan kenampakan inner cell mass (ICM) 16-40 sel. Zona pelusida

masih nampak. Embrio mulai bertransformasi dari morula ke blastula dengan dijumpainya blastocoelic cavity.

Hari ke-3

Pada tahap blastosis ini, terdapat jarak antara ICM dengan lapisan luar sel-sel trophoctoderm. Pada umumnya blastosis berlokasi di lumen uterus. Umur embrio = 3 dpc (kisaran 2-4 dpc)

Hari ke-4

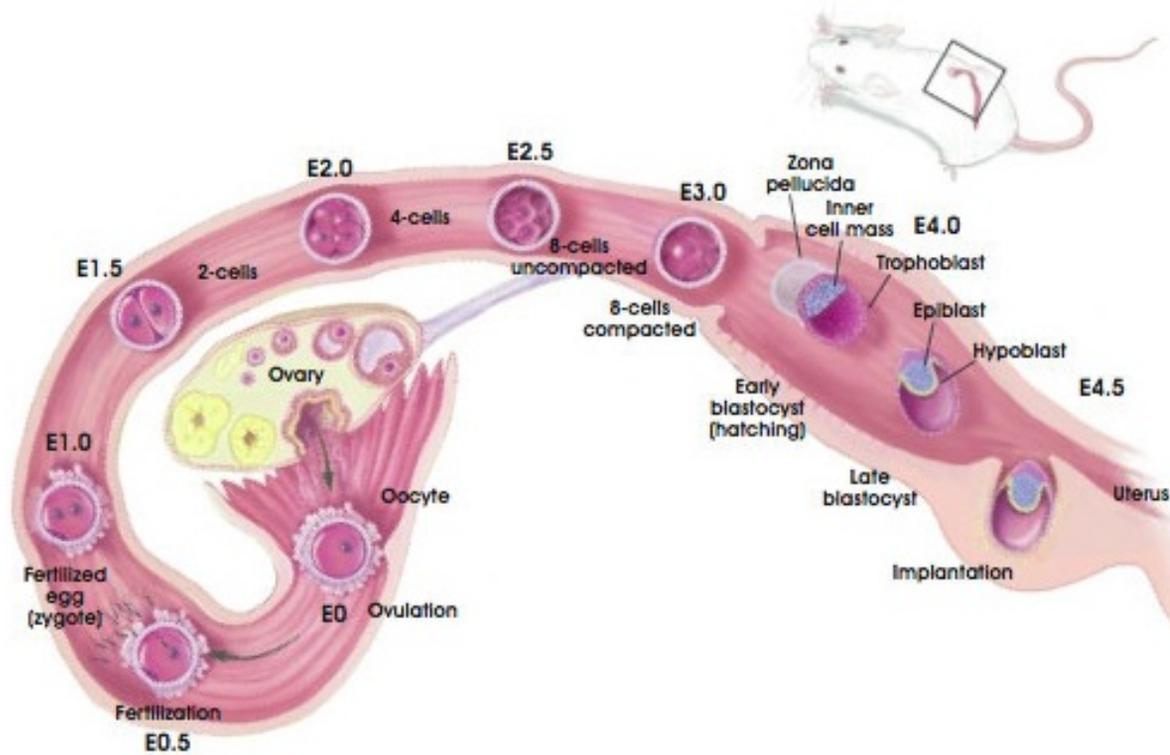
Zona pelusida sudah tidak dijumpai, terjadi implantasi blastosis, sel endoderm embryonik menyelubungi permukaan blastocoelic ICM. Umur embrio =4.5 dpc (kisaran 4.5-5 dpc).

Hari ke-5

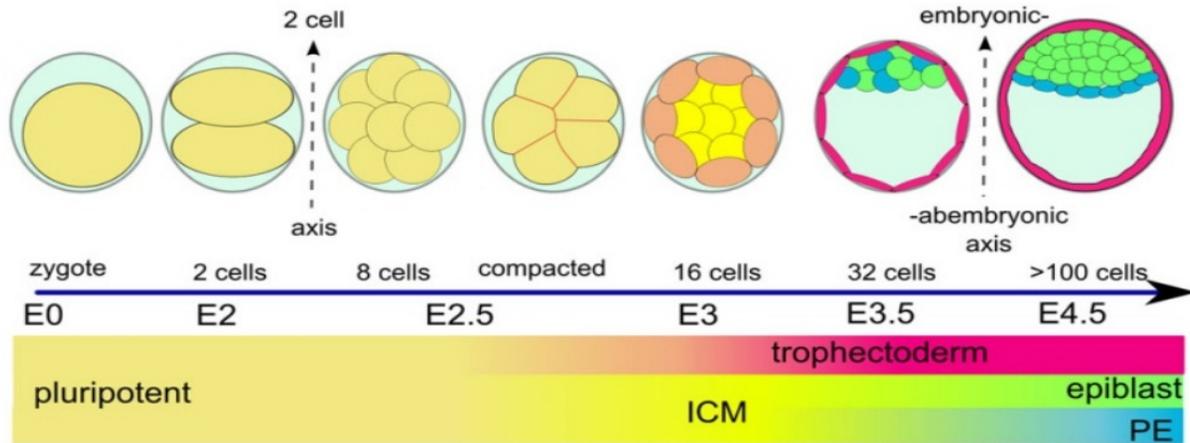
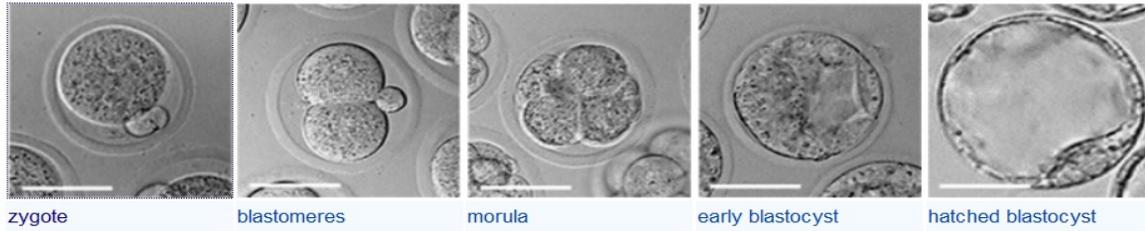
Adanya signal nodal dari bagian epiblast menginduksi pembentukan bagian distal visceral endoderm (DVE) yang akan membentuk aksis embrio anterior-posterior.

Hari ke-6

Reaksi lanjutan endometrial terjadi. Secara morfologi sudah dapat dibedakan dengan jelas antara embrionik dan ekstra embrionik ektoderm. Dimulainya proses gastrulasi, menghasilkan sel-sel mesodermal awal. Antara hari ke6 ke 7 mulai terbentuk prekursor jantung.



Gambar 56. Perkembangan awal embrio mencit
 Sumber: (Hill 2014)



Gambar 57. Skema tahapan perkembangan awal embrio mencit

Sumber: Hill, 2014

Hari ke-7

Terbentuk kantung amnion, dan calon allantoic muncul. Proses gastrulasi berlanjut dan nodus semakin nampak, keping neural mulai nampak, adanya tahap presomite, bakal allantoic makin memanjang, keping notochordal nampak, neural groove dapat diamati, terjadi head fold dan berlanjut pada perluasan foregut mulai terbentuk, migrasi bagian keping anterior lateral mesodermk menuju ke tengah membentuk bumbung jantung.

B. Perkembangan lanjut embrio mencit

Minggu ke-2

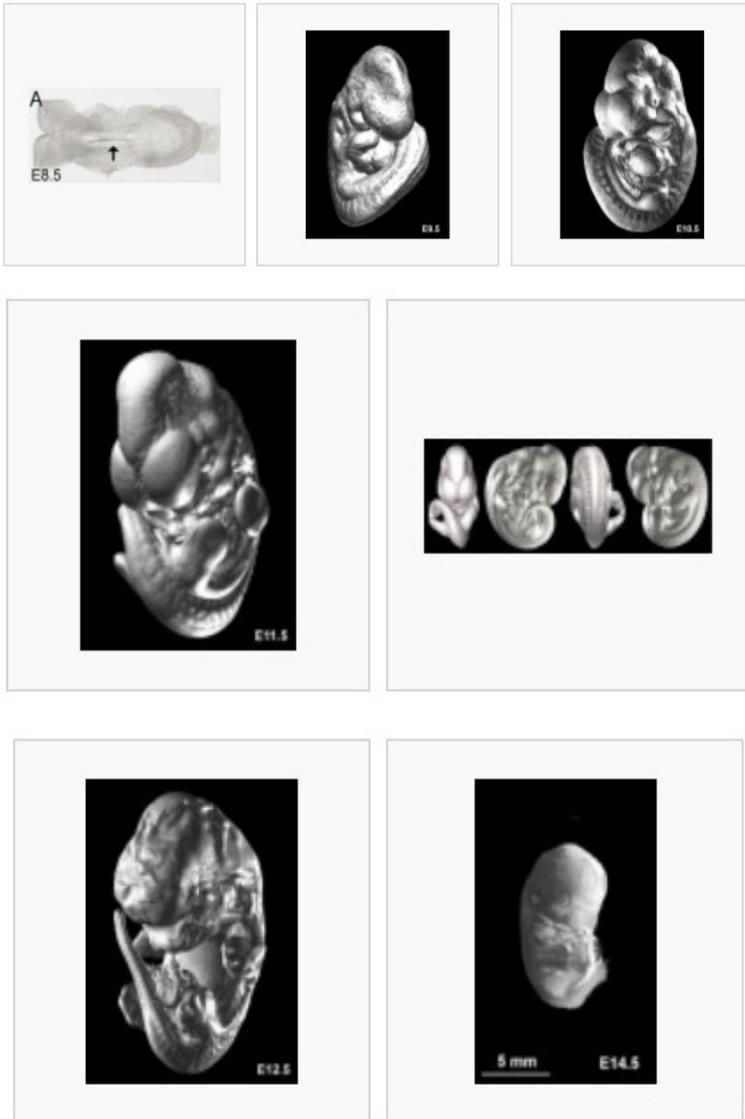
Hari ke-8

Nampak somite ke 1-4, allantoic meluas hingga ke dalam eksocoelom, keping cardiogenic dan kantung foregut jelas terlihat, komponen maksila dan archus branchial pertama muncul. Preotic sulcus nampak di somite no 2-3. Placoda optic muncul sebagai bakal optic pits. Pertumbuhan somite berlanjut menjadi 1-7 dan 8-12. Terbentuk anterior neuropore, bakal ekstremitas nampak, bakal jantung mengalami "looping".

Hari ke-9

Terbentuk posterior neuropore, bakal ekstremitas depan, Gembungan otak depan (Forebrain vesicle) berdiferensiasi menjadi telencephalon dan diencephalon. Ekstremitas

belakang menyusul muncul di somit 23-28. Bakal ekor nampak sebagai tonjolan kecil. Kantung Rathke terbentuk. Di



Gambar 58. Perkembangan lanjut embrio mencit.
Sumber: Hill, 2014

akhir hari ke 9, posterior neuropore mulai menutup, somit berjumlah 30-34.

Hari ke-10

Terjadi pemanjangan ekor, Neural crest berkembang lebih lanjut. Pembentukan ganglion sel vestibular (otic), disusul oleh macula utricula dan saccula serta cristae kanalis semisirkularis. Saluran pencernaan terus berkembang. Migrasi primordial germ cell. terbentuk mesenkim metanephric yang berkontribusi membentuk ginjal metanephros.

Hari ke-11

Somite di daerah cervical tidak nampak lagi, otak tumbuh dengan cepat, nasal pit mulai terbentuk, akhioran saraf efferent mulai mendekat sel-sel rambut. vesikula lensa terpisah dari permukaan dan terpisah dari ektoderm. Perkembangan lanjut dari ekstremitas depan. Gonad meulai berkembang ke arah jenis kelamin masing-masing. terbentuk septa atrium dan ventrikel jantung.

Hari ke-12

Telapak tangan dan kaki mulai jelas terbentuk, lapisan pigemnt retina nampak melalui kornea yang transparan. Perkembangan lanjut dari sistem genitalia, pembentukan tunika albuginea.

Hari ke-13

Bagian lengan dan pergelangan dapat dibedakan. Lima baris vibrissae nampak. Vesicle lensa kehilangan lumennya.

Terbentuk struktur cord ovarium yang nantinya berkaitan dengan perkembangan oosit. Satu lapis tunggal hepatoblast terbentuk dan dekat dengan portal mesenkim.

Hari ke-14

Jari-jari terpisah secara distal, Masing-masing jari di bagian anterior telapak kaki nampak terlihat, tulang panjang alat gerak berkembang, dijumpai folikel rambut di bagian pectoral, pelvic dan daerah trunkus. Daun telinga berorientasi ke depan.

Minggu ke-3

Hari ke-15

Jari-jari kaki mulai saling memisah. folikel rambut berada di daerah kepala namun tidak di dekat vibrissae.

Hari ke-16

Bakal kuku nampak di jari kaki.

Hari ke-17

Kulit mulai terlipat dan menebal. Vena subkutan mulai tidak nampak. Jari tangan dan kaki menjadi paralel dan umbilical hernia menghilang. kelopak mata menyatu. Sel-sel epitel sinus urogenitalis tumbuh menjadi mesenkim untuk membentuk bakal prostat. Kumis/vibrissae panjang

Hari ke-18

Pinna membesar, mata hampir terlihat melalui kelopak mata. sel-sel pulau langerhans berkembang. Sel-sel

mesenkim mammae membentuk puting susu. kumis atau vibrissae menebal dan memanjang

Hari ke-19

Mencit lahir dihari ke-19, dilanjutkan dengan perkembangan postnatal.

Hari ke-20 dan 21

Pendengaran dan keseimbangan berkembang dengan baik. Inervasi sistem vestibular telah berkembang baik secara morfologi maupun fisiologi.

C. Cryopreservasi embryo mencit

Cryopreservasi embrio merupakan teknik penyimpanan preimplantasi embrio dalam waktu yang relatif lama. Laju metabolisme dan perkembangan embrio tersebut dibekukan dalam suhu yang sangat rendah. Ketika embrio tersebut dibutuhkan, maka embrio dapat di thawing dan diimplantasikan kembali ke betina yang pseudopregnan.

Tujuan dari cryopreservasi embrio ini adalah untuk penyimpanan strain-strain yang mungkin langka, penggunaan embrio di masa datang, mencegah kontaminasi genetik atau mutasi dan perlindungan terhadap infeksi patogen.

Berbagai protokol cryopreservasi embryo mencit telah banyak dikembangkan. Berikut contoh protokol cryopreservasi embrio mencit.

1. Siapkan mencit betina yang disuperovulasi menggunakan PMS 5 IU per ekor
2. Setelah 48 jam, injeksi dengan HcG 5 IU per ekor dan kawinkan
3. Embryo yang dikoleksi harus dikoleksi dalam rentang 72 jam
4. Bedah oviduct
5. Bilas embryo menggunakan jarum tumpul (dull) dengan menyuntikkan PBS melalui infundibulum dan oviduct
6. Koleksi 8-sel embrio ke dalam tabung cryovial yang berisi 0.1 mL M-DPBS. isikan 25-30 embrio per tabung
7. Siapkan kotak es dengan suhu 0°C
8. Tambahkan 0.1 mL CPA-Cryoprotectant agent (mengandung DMSO) dan biarkan tabung vial berada di es sekitar 30 menit
9. Tempatkan vial kemudian dalam kotak es dengan suhu -6°C selama 2 menit
10. Pindahkan ke control freezer yang telah di set -6°C dan kemudian bekukan menjadi -80oC
11. Transfer vial ke LN2- liquid nitrogen (liquid fase) untuk penyimpanan yang lama

Sementara itu jika akan digunakan, berikut ini metode thawing yang dapat dilakukan:

1. Thawing tiap vial pada suhu temperatur selama 10 menit

2. Perlahan-lahan tambahkan 0.8 mL M-DPBS ke dalam vial yang berisi embrio, berikan tetes-demi tetes, Campur dengan cara pipetting
3. Siapkan dan tempatkan petri kultur organ di es dan pindah embrio dengan segera
4. Embrio dapat ditransfer ke oviduct pseudopregnant resipien. Sekitar 10-12 embrio dapat ditransfer per ekor betina resipien.

D. In vitro fertilization (IVF) pada mencit

Semakin pesatnya perkembangan teknologi khususnya teknologi reproduksi telah banyak menghasilkan terobosan-terobosan teknologi yang sangat menguntungkan, diantaranya adalah teknologi In vitro Fertilization (IVF). Teknologi IVF adalah teknologi untuk menghasilkan embrio secara in vitro yang melibatkan transfer embrio dan pembekuan embrio.

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan IVF yaitu: maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa, dan kondisi fisiologis medium kultur.

Berikut ini adalah contoh pelaksanaan IVF dengan yang diambil dari penelitian Widjiati, dkk. (2012) menggunakan medium M16 dan Human Tubal Fluid).

1. Persiapan medium. Perispan medium M16 dan HTF dibuat sesuai dengan komposisi yang telah disediakan. Medium tersebut dibuat sebagai medium tetes (drop)

- dalam cawan petri dengan volume 50 μ L sebagai medium pencuci dan 25 μ L sebagai medium kultur in vitro.
2. Medium tetes kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 3 jam sebelum digunakan untuk fertilisasi in vitro
 3. Koleksi sel telur yang berasal dari superovulasi mencit dapat dilakukan dengan hormon PMSG 5 IU dan 48 jam kemudian hCG secara intraperitoneal. Mencit kemudian dikawinkan dengan mencit jantan vasektomi secara monogami untuk menggerakkan ovulasi. Setelah 17 jam, lakukan pemeriksaan terbentuknya vaginal plug dan segera lakukan flushing sel telur. Mencit betina tersebut didislokasi leher untuk diambil uterus serta pengangkatan oviduct. Lakukan pembilasan dengan menggunakan medium M16 dan diletakkan di cawan petri untuk proses flushing sel telur dengan bantuan mikroskop inverted.
 4. Koleksi sel telur dilakukan dengan pipet pasteur yang telah dimodifikasi. Sel telur kemudian dicuci dengan medium M16 dan HTF sebanyak 3 x hingga sel telur bebas dari sel-sel kumulus. Sel telur selanjutnya dipindahkan ke cawan petri yang telah berisi medium M16 dan HTF yang baru diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama satu jam.
 5. Untuk persiapan spermatozoa, mencit jantan didislokasi leher dan diambil bagian cauda epididimis. Cauda

epididimis tersebut dicuci dengan medium M16 dan diletakkan dalam cawan petri berisi 1 mL medium M16. Untuk pengambilan spermatozoa, cauda epididimis digunting kecil-kecil kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 1 jam.

6. Pelaksanaan IVF dilakukan dengan mencampurkan sel telur dan spermatozoa, dikultur dalam medium M16 dan medium HTF, inkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 12 jam. Zigot yang terbentuk diperiksa dan dipindahkan ke dalam medium kultur baru untuk kultur in vitro dan diinkubasikan kembali pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C dan diperiksa setiap 24 jam.
7. Dengan teknik di atas akan dihasilkan angka fertilitas pada medium M16 98.09% dan medium HTF 99,57%

Tabel 14. Komposisi medium M16 dan HTF

M16 (mg/mL)		HTF (mg/mL)	
NaCl	94.7	NaCl	5930
KCl	4.78	KCl	350
KH ₂ PO ₄	1.19	CaCl ₂ 2H ₂ O	300
MgSO ₄	1.19	MgSO ₄ 7H ₂ O	51
CaCl ₂	1.71	NaHCO ₃	330
NaH ₂ CO ₃	25	HEPES	4770
Na Laktat	23.3	Na Laktat	2363.4
Na Piruvat	0.33	Na Piruvat	37
Glukosa	5.56	Glukosa	550
Bovine Serum	4	Gentamicin	10
Albumin (BSA)		KH ₂ PO ₄	50
Dapat Ditambahkan Penicilin, streptomycin, fenol red dan EDTA			

(Sumber: M16 = Biggers, 1998; HTF = Verviers, 2007)

BAB 15 PENELITIAN KANKER PADA MENCIT

Jumlah penderita kanker di tahun-tahun terakhir meningkat tajam di Indonesia. Data terakhir dari kementerian kesehatan tahun 2012 menunjukkan prevalensi penderita kanker di Indonesia mencapai 3,3 banding 1000 orang. Sementara itu diperkirakan bahwa pada tahun 2015, sebanyak 9 juta orang meninggal akibat kanker. Jumlah tersebut meliputi kanker payudara yang jumlahnya terus meningkat di Indonesia bahkan diidentifikasi dengan jumlah tertinggi di Indonesia, kanker cervix, kanker prostat, kanker leukemia, kanker paru-paru dan kanker kolon.

Berbagai penelitian mengenai uji senyawa antikanker dan yang terkait melibatkan mencit sebagai hewan uji. Berikut ini beberapa teknis penggunaan mencit sebagai hewan uji dalam penelitian mengenai tumor dan kanker.

Pada umumnya mencit yang akan digunakan sebagai objek penelitian tentang kanker harus dilakukan prosedur untuk membuat mencit mengidap tumor atau kanker. Berikut ini beberapa cara membuat mencit menderita tumor atau kanker yaitu:

A. Tranplantasi jaringan tumor pada mencit

Bahan untuk transplantasi tumor pada mencit yaitu Alkohol 70%, larutan garam fisiologik, mencit donor bertumor dan mencit resipien. Sementara alat-alat yang digunakan adalah: cawan petri, spuit, jarum suntik trocar, satu set gunting, pinset anatomi serta alas fiksasi.

Setelah mencit diaklimatisasi, mencit kemudian di transplantasi jaringan tumor. Diamati selama 4 hari dan jaringan tumor yang telah diinokulasikan tidak mengalami regresi. Mencit tersebut dapat digunakan untuk percobaan tumor.

Adapun prosedur transplantasi tumor sebagai berikut:

- a. Mencit yang telah mengidap tumor (mencit donor) dimatikan dengan menggunakan eter. Lakukan pembedahan dan kulit yang menderita tumor diusap dengan alkohol 70%
- b. Dibuat sayatan dengan gunting lurus untuk mengeluarkan tumor
- c. Tumor diletakkan di cawan petri (Cawan dicuci dengan garam fisiologi dan diletakkan di atas es)
- d. Ambil dan potong jaringan tumor yang masih baik (tanpa nekrosis), kira-kira dapat menghasilkan suspensi tumor 1 mL dan ditempatkan di cawan petri lain.
- e. Bersihkan tumor yang telah dipisahkan dari jaringan ikat, jaringan nekrotik, jaringan darah. Kemduain lakukan pencacahan atau dipotong-potong sampai halus dengan

menggunakan gunting hingga terbentuk suspensi tumor (bubur tumor). Usahakan partikel yang ada dapat melewati jarum trokar.

- f. Tambahkan garam fisiologis dengan jumlah sama banyak dengan volume tumor yang telah dibuat.
- g. Bubur tumor sebanyak 0.2 mL disuntikkan secara subkutan di aksila kanan mencit (Mencit resipien).
- h. Mencit siap dipelihara dan digunakan untuk percobaan zat antitumor

B. Induksi dengan Benzo(a)pyren

Mencit dapat dibuat mengidap karsinoma dengan cara diinduksi dengan senyawa Benzo(a)pyren 2 hari sekali hingga 5 kali. Larutan yang digunakan adalah 0.3 g Benzo(a)pyren dalam 0.2 mL oleum olivarum dan diinjeksikan secara subcutaneous cervic. Jaringan kanker akan terlihat pada minggu ke 15 (Nurhayati et al. 2011).

C. Induksi dengan Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)

Metode telah dibuktikan sebagai metode uji karsinogenitas yang baik dan sensitif. Mencit yang baru lahir yaitu berumur kurang dari 24 jam, disuntik dengan DMBA 0.25mg dalam pelarut minyak wijen dengan kadar 0.5% secara intraperitoneal. Setelah dipelihara hingga umur 21 hari, mencit dapat digunakan untuk percobaan (Syukri & Saepudin 2008).

D. Induksi dengan Dimethylhidrazine

Mencit dapat diinduksi untuk mengidap kanker dengan cara pemberian Dimethylhydrazine di air minumnya. Mencit yang Dimethylhydrazine di air minumnya dengan kadar 10 ppm akan mempunyai kemungkinan 95% menderita tumor vaskuler di berbagai jaringan otot, hepar, dan jaringan pararenal). Tumor yang terbentuk adalah tipe angiosarcomas

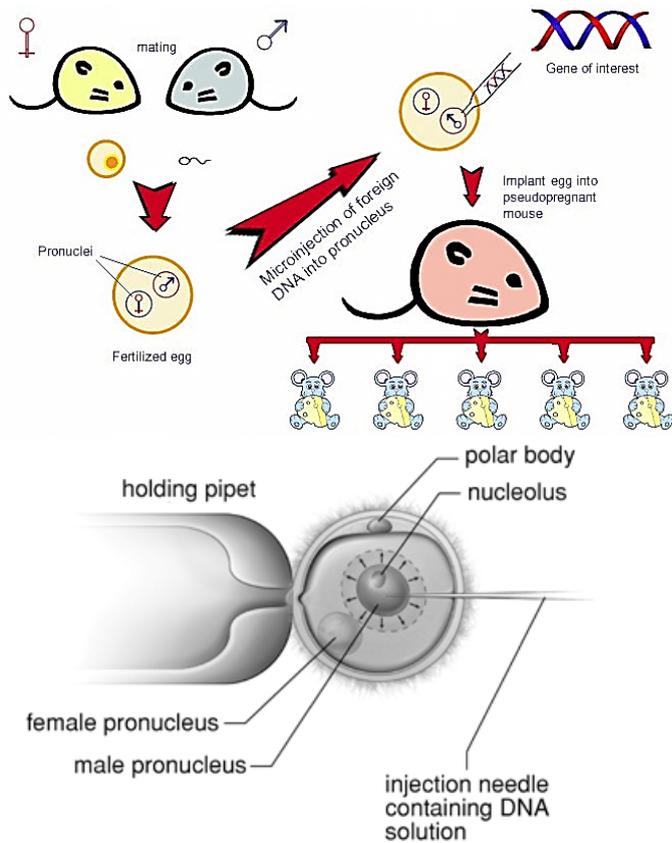
BAB 16 MENCIT TRANSGENIK

Di era yang semakin maju baik dalam dunia ilmu pengetahuan khususnya bidang medis, bioteknologi dan bidang terkait lainnya. Mencit transgenik sangat populer digunakan sebagai hewan percobaan. Mencit transgenik adalah mencit yang telah direkayasa secara genetik dengan jalan menyisipkan gen, sehingga menghasilkan mencit transgenik yang memiliki sifat tertentu sesuai dengan keinginan peneliti.

Ada beberapa cara membuat mencit transgenik yaitu:

A. DNA mikroinjeksi

Dengan teknik DNA mikroinjeksi, gen tertentu diambil dari spesies yang sama atau berbeda diinjeksikan ke dalam pronukleus ovum yang telah dibuahi. Injeksi ini menggunakan jarum khusus yang sangat halus. Jarum tersebut dapat menembus membran tanpa merusaknya dan masuk melalui protein integral. DNA yang akan disisipkan, dimasukkan langsung ke dalam zigot dengan alat tersebut. Dalam metode ini tidak diperlukan vektor atau perantara DNA. Percobaan DNA mikroinjeksi pertama kali dicoba pada tikus.



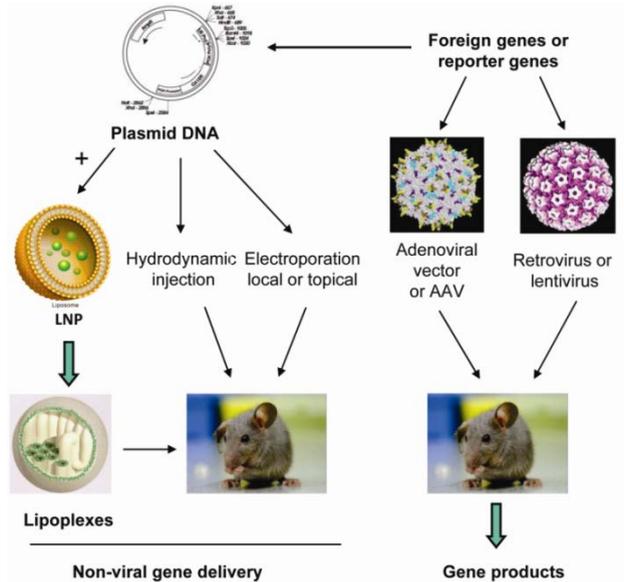
Gambar 59. DNA mikroinjeksi mencit transgenik.

Sumber: https://www.ied.edu.hk/biotech/eng/classrm/class_agr2.html
<http://translatingscience.pbworks.com/w/page/23087301/Livestock>

B. Transfer gen dengan perantara retrovirus

Sementara itu, retrovirus juga dapat digunakan untuk pembuatan mencit transgenik. Transfer gen dilakukan menggunakan media retrovirus sebagai vector dan injeksikan DNA ke dalam sel inang. DNA dari retrovirus kemudian akan berintegrasi ke dalam germ. Setelah infeksi, retrovirus menggandakan DNA dari genom mRNA menggunakan enzim virus yaitu reverse transcriptase.

Sebagian besar retrovirus dan keturunan sejenis merupakan ecotropic yaitu hanya menginfeksi rodensia seperti tikus dan mencit.

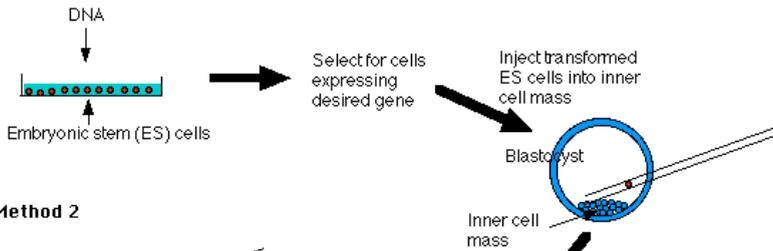


Gambar 60. Transgenik mencit dengan memanfaatkan retrovirus

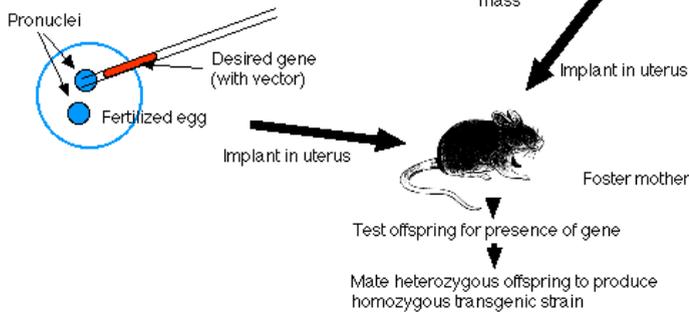
C. Stem sel embrionik

Teknologi embryonic stem cells telah digunakan untuk memproduksi model tikus. Pluripotensial sel embrionik didapat dari embrio preimplantasi awal dan dipertahankan pada kultur selama periode tertentu untuk menunjukkan beberapa manipulasi in vitro. Sel kemungkinan dapat diinjeksi langsung pada blastocoel blastosit host atau diinkubasi bergabung dengan morula. Embrio host kemudian ditransfer pada host intermediate atau betina pengganti untuk kelanjutan perkembangan.

Method 1

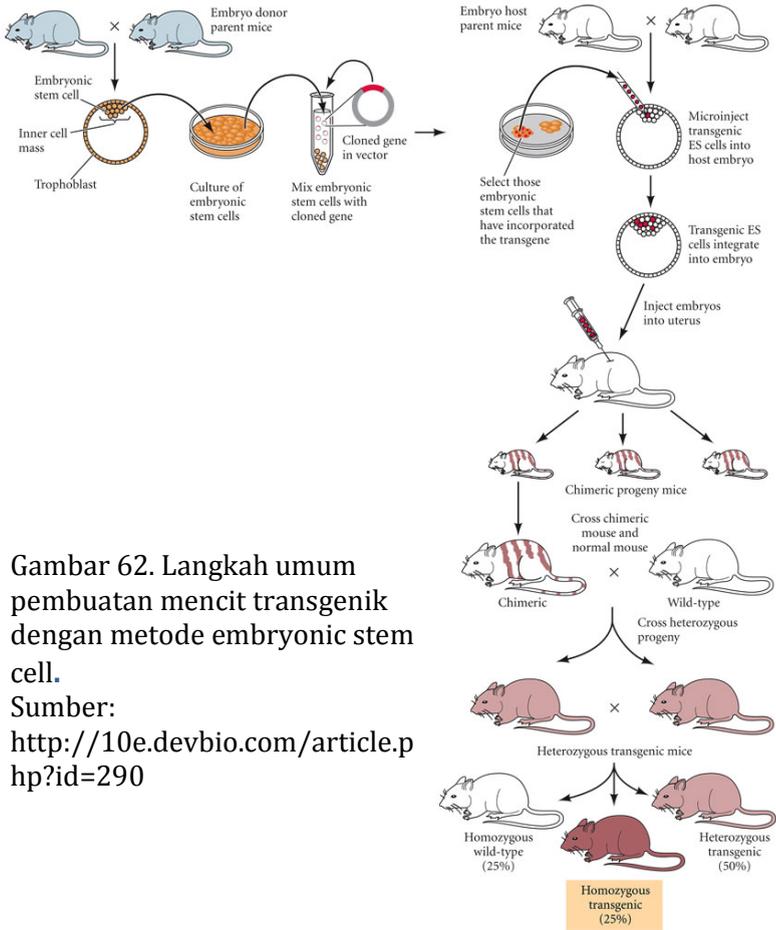


Method 2



Gambar 61. Teknologi embryonic stem cell

Sumber: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/TransgenicAnimals.html>



Gambar 62. Langkah umum pembuatan mencit transgenik dengan metode embryonic stem cell.

Sumber:
<http://10e.devbio.com/article.php?id=290>

BAB 17 ETIKA HEWAN (ANIMAL ETHICS)

Etika hewan atau dikenal dengan animal ethics, terus menjadi pemberitaan yang penting di dalam dunia penelitian. Pada dasarnya aturan etika hewan berprinsip untuk mengatur peneliti agar bertanggung jawab terhadap semua penggunaan hewan uji, baik mulai dari pemeliharaan sebelum digunakan sebagai percobaan hingga dikorbankan sebagai sampel penelitian. Termasuk juga cara transportasi dari tempat asal hewan uji, hingga ke tempat penelitian akan berlangsung.

Dalam konteks yang detail, kode etik penggunaan hewan uji ini bermaksud untuk mencegah terjadinya penyalahgunaan dan penganiayaan terhadap hewan uji. Di samping itu menjamin hewan uji diperlakukan dengan baik pada masa pra-penelitian, penelitian maupun pasca penelitian, sehingga hasilnya dari percobaan dapat dimanfaatkan dengan baik dan sebesar-besarnya bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Di negara-negara maju, penerapan kode etik hewan untuk keperluan penelitian sangat ketat diberlakukan. Di negara-negara maju seperti Amerika, Australia telah ada regulasi yang mengatur penggunaan hewan untuk keperluan penelitian. Hewan-hewan uji yang mendapat

payung hukum tidak saja hewan-hewan tingkat tinggi yang termasuk dalam kelompok mamalia, namun hingga kelompok pisces juga telah mendapatkan kode etik penggunaan hewan dalam kelompok tersebut.

Bagaimana dengan di negara Indonesia???. Implementasi kode etik hewan uji sudah diawali dengan adanya keputusan bersama Menteri Negara Riset dan Teknologi No 108/M/Kp/IX/2004, Menteri Kesehatan No 1045/Menkes/SKB/IX/2004 dan Menteri Pertanian No 540.1/Kpst/OT.160/9/2004 mengenai pembentukan komisi bioetik nasional (KBN) dan komisi nasional etik penelitian. Komisi tersebut merupakan pelembagaan penanganan masalah bioetik dan etik tingkat nasional. Berangkat dari pemikiran kebutuhan pemakaian hewan uji untuk riset *in vivo* termasuk penggunaan hewan uji untuk keperluan edukasi, kode etik penggunaan hewan uji menjadi hal yang sangat penting dan mendesak untuk direalisasikan.

Mendesak untuk direalisasikan menyeluruh dikarenakan masih banyak penelitian di bidang ilmu dasar dan biomedika dalam prakteknya menimbulkan berbagai masalah etika. Tidak hanya itu, penggunaan hewan uji dalam konteks pengajaran, pendidikan seperti praktikum atau demonstrasi yang digunakan dalam ilmu-ilmu dasar, pertanian, perikanan, peternakan serta biomedik banyak yang tidak memenuhi kaidah kesejahteraan hewan.

Tidak adanya perancangan dan perencanaan matang penelitian ataupun demonstrasi dengan hewan uji menyebabkan resiko yang ditimbulkan terhadap nasib hewan menjadi tidak baik dampaknya juga kan menimbulkan hasil penelitian yang tidak valid.

Dengan tidak adanya perencanaan penelitian yang matang, yang timbul pada hewan uji bukanlah asas manfaat yang dapat diperoleh dari hewan uji namun eksploitasi terhadap hewan uji. Kejadian-kejadian eksploitasi tersebut akan menimbulkan implikasi etik, hukum dan sosial budaya.



Sebenarnya sudah banyak argumen atau reaksi keras dari peneliti atau dari organisasi serta masyarakat umum untuk menghindari penggunaan hewan uji sebagai objek penelitian.

Bila memungkinkan hewan uji dalam penelitian dapat

diganti dengan objek lain seperti kultur organ, jaringan, sel atau sedapat mungkin mengurangi jumlah hewan uji.

Tidak dipungkiri, penggunaan hewan uji dalam berbagai riset telah banyak membuahkan manfaat yang besar bagi perkembangan ilmu penelitian dan manfaat terhadap masyarakat secara luas. Namun masih saja timbul pertanyaan mengenai tindakan menyakiti hewan uji, bagaimana perlakuan terhadap hewan uji, apakah penanganan hewan uji telah benar sesuai dengan aturan internasional yang berlaku. Hal-hal tersebut memerlukan urgensi penerapan kode etik penggunaan hewan di Indonesia.

Penerapan kode etik penggunaan hewan uji masih belum sepenuhnya dilaksanakan. Hanya beberapa universitas universitas-universitas besar dan badan-badan riset yang telah menerapkan kode etik hewan dengan ketat.

Sebagai contoh di beberapa universitas negeri di Indonesia telah menerapkan kebijakan penggunaan hewan uji untuk kepentingan penelitian. Komisi etik penelitian di universitas tersebut tidak akan memproses penelitian-penelitian yang sudah pernah dilakukan.

Hal tersebut patut untuk diterapkan disemua universitas-universitas maupun instansi-instansi yang bersinggungan dengan hewan uji sebagai objek penelitian. Sekali lagi, hal bertujuan untuk meminimalkan penggunaan hewan uji serta efisiensi pemakaian hewan uji dalam suatu

penelitian. dan kembali kepada prinsip 3 R, yaitu: replacement, reduction dan refinement.

Penggunaan hewan uji sebagai di bidang biomedik dan farmakologi sebagai pengganti manusia telah tertuang dan direkomendasikan di dalam deklarasi Helsinki dari sidang kesehatan dunia ke-16 Helsinki-Finlandia tahun 1964. Deklarasi tersebut merekomendasikan segi etik penelitian dengan obyek manusia dalam bidang biomedis dan riset terkait, perlu diganti dengan hewan uji dan memenuhi kaidah etika penelitian.

Kaidah etika penelitian dalam bidang kesehatan telah tercantum dalam World Medical Association yang mengandung tiga aspek penting yaitu: respect; beneficiary dan justice (Anonymous,1964). Aspek respect berarti memberikan hak dan martabat terhadap makhluk hidup, kebebasan memilih dan berkeinginan dan bertanggung jawab terhadap dirinya termasuk hewan uji, sementara aspek beneficiary mensyaratkan faktor manfaat bagi manusia dan makhluk lain, manfaat yang yang diperoleh harus sebanding atau lebih besar dari resiko yang ada dan mungkin terjadi. Aspek justice mengacu pada sikap adil dalam pemanfaatan hewan percobaan.

Sebagai contoh yang tidak mengikuti kaidah dari tiga aspek tersebut adalah pemanfaatan hewan uji dengan penyuntikan berulang-ulang dengan dalih penghematan biaya dan jumlah hewan uji, serta teknik

ethanasia yang menimbulkan rasa sakit dan nyeri berkepanjangan bagi hewan uji. Oleh karena pentingnya pengetahuan tentang hewan uji dalam penelitian-penelitian laboratoris, maka teknik penanganan hewan uji laboratoris sangat diperlukan bagi peneliti. Ada beberapa faktor lain yang harus diketahui peneliti dalam rangka penggunaan hewan uji laboratoris, yaitu:

1. Kondisi internal hewan uji yang meliputi usia hewan, jenis kelamin serta berat badan hewan uji.
2. Faktor lingkungan seperti jenis tempat pemeliharaan, bahan tempat pemeliharaan, populasi di dalam ruang pemeliharaan serta perlakuan hewan percobaan saat penelitian berjalan.

Selain kedua faktor di atas, konsep 3R, replacement, reduction dan refinement harus juga mendapat perhatian (Ridwan, 2013). Konsep replacement mengacu pada dua hal yaitu relatif, jika hewan uji dapat digantikan dengan memakai organ/ jaringan dari rumah potong atau hewan yang berordo lebih rendah akan lebih baik dan absolut, jika hewan uji dapat digantikan dengan kultur sel, jaringan atau pemrograman komputer. Konsep kedua yaitu reduction, mengacu pada penggunaan hewan uji dengan jumlah seminim mungkin namun tetap menghasilkan keluaran yang optimum. Untuk keperluan perhitungan jumlah minimum hewan, rumus Federer

dapat digunakan.

Rumus Federer = $(n-1)(t-1)$ 15

n= jumlah hewan percobaan

t = jumlah kelompok dalam percobaan

Sebagai contoh:

Jika jumlah kelompok dalam percobaan $t=3$, maka jumlah replikasi

(n) harus 9 untuk mendapatkan angka lebih dari

15. Sementara jika $t = 5$, maka jumlah replikasi minimal adalah 5.

Rumus tersebut perlu dibantu dengan penggunaan desain statistika yang tepat agar hasil penelitian optimal. Hal tersebut dikarenakan semakin sedikit kelompok penelitian maka makin banyak hewan uji yang digunakan dan sebaliknya. Konsep yang terakhir adalah refinement, yaitu memperlakukan hewan secara manusia, termasuk didalamnya pemeliharaan saat masa percobaan, meminimalkan rasa sakit dengan teknik euthanasia yang tepat, menjamin kesejahteraan hewan hingga masa percobaan berakhir.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Adnan 2008, Perkembangan hewan (Jurusan Biologi FMIPA UNM, Makasar: UNM)
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 2-11.
- Anggorodi, R. 1979, Ilmu Makanan Ternak Umum (Jakarta: PT Gramedia Pustaka)
- Anonimous 2002. The Eijkman Institute Research Ethics Commission. Jakarta, Riset Lembaga Eijkman, Komisi Etik.
- Ansel, H. C. 1989, Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi (Jakarta: Universitas Indonesia Press)
- Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M. & Miran, R. A. 2014. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephro-urology monthly*, 6(1).
- Biggers, J. D. 2004. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *International Journal of Developmental Biology*, 42(7), 879-884.
- Blake, J. A., Bult, C. J., Eppig, J. T., Kadin, J. A., Richardson, J. E., & Mouse Genome Database Group. 2013. The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse. *Nucleic acids research*, 42(D1), D810-D817.
- Candy, C. J., Wood, M. J., & Whittingham, D. G. 1995. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*, 10(9), 2334-2338.
- Dinnyés, A., Dai, Y., Jiang, S., & Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of reproduction*, 63(2), 513-518.
- Fox, J. G. 2015. *Laboratory animal medicine*. Elsevier.

- Fox, J. G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., & Smith, A. 2006. The mouse in biomedical research: normative biology, husbandry, and models (Vol. 3). Elsevier.
- Gao, D., & Critser, J. K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, 41(4), 187-196.
- Glenister, P. H. & C. E. Thornton 1998. MRC Mammalian Genetics Unit. Harwell, OX11 0RD. United Kingdom.
- Gook, D. A., McCully, B. A., Edgar, D. H., & McBain, J. C. 2001. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Human Reproduction*, 16(3), 417-422.
- Gunawijaya, F. A., Gandasentana, R., & Wahyudi, K. 1999. Efek Pemberian Katekin Teh Hijau Pada Pertumbuhan Tumor Kelenjar Susu Mencit Strain GR. *Jurnal kedokteran trisakti*, 18(2).
- Hafez, E. S. E. 1993, *Reproduksi in Farm Animal* (6th ed.; Philadelphia: Lea and Febiger
- Harp, R., Leibach, J., Black, J., Keldahl, C., & Karow, A. 1994. Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology*, 31(4), 336-343.
- Heller, J. L. 2014. Hypovolemic shock. Seattle, Washington, Emergency Medicine, Virginia Mason Medical Center.
- Hill, M. A. 2014. Embryology Contributors. New South Wales, Australia, UNSW Embryology.
- Hoogenkamp, H., & Lewing, P. 1982. Superovulation in mice in relation to their age. *Veterinary Quarterly*, 4(1), 47-48.
- Inglis, J. K. 1980, *Introduction to Laboratory Animal Science and Technology* (Oxford: Pergamon Press Ltd, Oxford
- Isbagio, D., & Widyaningroem, D. 1992. Euthanasia pada hewan percobaan. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 2(1).
- Jacoby, R. O., Fox, J. G., & Davisson, M. 2002. Biology and diseases of mice. *Laboratory animal medicine*, 2, 35-120.
- Malole, M. B. M. & C. S. U. Pramono 1989, *Penggunaan hewan-hewan percobaan di laboratorium* (Institut

- Pertanian Bogor, Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi)
- Mochida, K., Hasegawa, A., Li, M. W., Fray, M. D., Kito, S., Vallelunga, J. M. & Ogura, A. 2013. High osmolality vitrification: a new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PLoS One*, 8(1), e49316.
- Mohamad, K., Eriani, K., Djuwita, I., & Boediono, A. 1999. Perkembangan in vitro dan in vivo embrio mencit tanpa zona pelusida. *Media Veteriner*, Majalah ilmu kedokteran veteriner Indonesia, 6, 1.
- Nafiu, L. O. 1996. Kelenturan fenotipik mencit (*Mus musculus*) terhadap ransum berprotein rendah. Program Pascasarjana. Bogor, Institut Pertanian Bogor. Thesis.
- Nalbandov, A. V. 1990, Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas: fisiologi komparatif pada hewan domestikasi dan laboratorium serta manusia (Jakarta: UI-Press
- Newton, H., Fisher, J., Arnold, J. R. P., Pegg, D. E., Faddy, M. J., & Gosden, R. G. 1998. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Human Reproduction*, 13(2), 376-380.
- Nugraheni, T., Astirin, O. P., & Widiyani, T. 2003. Pengaruh vitamin c terhadap perbaikan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah pemberian ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Biofarmasi*, 1(1), 13-19.
- Nurhayati, A. P. D., Hidayati, D., Prastiwi, R., Widyarini, S., Sukardiman, S., & Pujitono, W. 2011. Histology of Mice Skin Tissue Based on in Vivo Evaluation of the Anticancer Extracts of Marine Sponge *Aaptos Suberitoides*. *IPTEK The Journal for Technology and Science*, 22(1).
- Otubanjo, O. A., Mosuro, A. A., & Ladipo, T. F. 2007. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology by ivermectin MSD (Mectizan). *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(1), 90-95.

- Palmer, N. O., H. W. Bakos, J. A. Owens, B. P. Setchell & M. Lane 2012, Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function, Vol. 302 <http://ajpendo.physiology.org/ajpendo/302/7/E768.full.pdf>
- Payne, J. & C. M. Francis 2000, Mamalia di Kalimantan, Sabah Sarawak dan Brunei Darussalam (Bogor: Wild Life Conservation Society)
- Rall, W. F., & Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573.
- Ridwan, E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*, 63(3), 112-6.
- Rogers, P., & Webb, G. P. 1980. Estimation of body fat in normal and obese mice. *British Journal of Nutrition*, 43(1), 83-86.
- Rosa, F. 2014. Normal mouse anatomy on 3 T MRI. *European Congress of Radiology*.
- Sanocka, D., & Kurpisz, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 12
- Shaw, R., Festing, M. F., Peers, I., & Furlong, L. 2002. Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use. *ILAR journal*, 43(4), 223-232.
- Smith, B. J. & S. Mangkoewidjojo 1988, Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis Indonesia (Jakarta: University Press)
- Somala, L. 2006. Sifat reproduksi mencit (*Mus musculus*) betina yang mendapat pakan tambahan kemangi (*Ocimum basilicum*) kering. Program studi teknologi produksi ternak Fakultas Peternakan. Bogor, Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Suckow, M. A., P. Danneman & C. Brayton 2001, *The Laboratory Mouse, Laboratory Animal Pocket Reference Series* (Boca Raton London New York Washington DC: CRC Press)

- Sudono, A. 1981. Pengaruh interaksi antara genotipa dan lingkungan terhadap pertumbuhan, keefisienan makanan, daya reproduksi dan produksi susu mencit. Fakultas Pascasarjana. Bogor, Institut Pertanian Bogor. Disertasi.
- Sugimoto, M., Maeda, S., Manabe, N., & Miyamoto, H. 2000. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*, 53(5), 1093-1103.
- Sumantri, C. 1984. Aspek genetik beberapa sifat produksi mencit (*Mus musculus*). Fakultas Peternakan. Bogor, Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Syukri, Y., & Saepudin, S. 2008. Aktivitas Penghambatan Kejadian Kanker Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa Boerl*) Pada Mencit yang Diinduksi 7, 12-Dimetilbenz (a) antrasen. *Jurnal Logika*, 5(1).
- Mukaida, T., & Kasai, M. 2004. Cryobiology: slow freezing and vitrification of embryos. A laboratory guide to the mammalian embryo (Ed. DK Gardner, M. Lane and AJ Watson). Oxford University Press, Inc., New York, 375-390.
- Takeo, T., & Nakagata, N. 2010. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory animals*, 44(2), 132-137.
- Thornton, C. E., Brown, S. D., & Glenister, P. H. 1999. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mammalian Genome*, 10(10), 987-992.
- Toelihere, M. R. 1979a, Fisiologi reproduksi pada ternak (Bandung: Penerbit Angkasa)
- Toelihere, M. R. 1979b, Inseminasi buatan pada ternak (Bandung: Penerbit Angkasa)

- Treuting, P. M., S. M. Dintzis & K. S. Montine (2012). Comparative Pathology: Closing A Gap. Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas. P. M. Treuting, S. M. Dintzis, C. W. Frevert, D. Liggitt and K. S. Montine. Oxford, UK, Academic Press: 35.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Molecular reproduction and development, 51(1), 53-58.
- Vervier, L. 2007. IVF Culture media. S. P. R. L. Lonza Verviers. Belgium, techsup.europe@lonza.com.
- Vogel, P., Hansen, G., Fontenot, G., & Read, R. 2010. Tubulin Tyrosine Ligase-Like 1 Deficiency Results in Chronic Rhinosinusitis and Abnormal Development of Spermatid Flagella in Mice. Veterinary pathology, 47(4), 703-712.
- Warwick, E. J., J. M. Astuti & W. Hardjosubroto 1983, Pemuliaan Ternak (Yogyakarta: Gadjah Mada University Press)
- Wibowo, B. 1984. Aspek genetik bobot badan mencit (*Mus musculus*). Fakultas Peternakan. Bogor, Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Widiyani, T. 2006. Antifertility effects of som jawa (*Talinum paniculatum* gaertn.) root extract on male mice (*Mus musculus* L.). buletin penelitian kesehatan, 34(3), 119-128.
- Wildan, Y. 1994, Reproduksi dan Embriologi (Bandung: Tarsito)
- Yokozawa, T., Nakagawa, T., & Kitani, K. 2002. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(12), 3549-3552.
- Yuwono, S. S., Sulaksono, E., & Yekti, R. P. 1994. Keadaan nilai normal baku mencit strain CBR Swiss Derived di pusat penelitian penyakit menular. Kalbe Jakarta. <http://www.kalbefarma.com> [Diakses pada 20 Desember 2016]

- Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., Jensen, F., Woidacki, K., & Zenclussen, A. C. 2014. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in endocrinology*, 5, 32
- Zhu, S. E., Kasai, M., Otoge, H., Sakurai, T., & Machida, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98(1), 139-145..
- Zulfa, I. 2006. Pengaruh pemberian jus tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill) terhadap morfologi spermatozoa mencit strain *Balb/c* jantan yang dipapar asap rokok. Fakultas kedokteran Semarang, Universitas Diponegoro.