

Kajian *In vitro* Aktivitas Sel-Sel Trofoblas Blastosis Mencit *Aging* dan Pengaruhnya terhadap Kegagalan Implantasi

(*IN VITRO STUDIES OF AGING MICE BLASTOCYST TROPHOBLAST CELLS ACTIVITY AND ITS EFFECT ON THE IMPLANTATION FAILURES*)

Ita Djuwita^{1✉}, Roza Helmita², Adi Winarto¹ dan Wahyudin¹

¹Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

²Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Lancang Kuning, Jalan Yos Yudarso Km 8 Rumbai, Pekanbaru, Riau
Email : djuwitawiryadi@yahoo.com

ABSTRACT

The objectives of this *in vitro* study were to investigate the hatching rate, the outgrowth diameter and the activity of mitochondria Nicotiamide Adenin Dinucleotide Dyhydrogenase (NADH)-CoQ reductase of blastocysts trophoblast cells from aging mice. Blastocysts of aging (age ≥ 12 months) and young productive (age 2 months) mice were collected from the cornua utery at day-4 of pregnancy and were cultured in mDMEM medium supplemented with 10% New Born Calf Serum (NBCS), 10% ITS, and 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicine, in 5% CO_2 incubator at 37°C for 10 days. The blastocysts hatching rate and the trophoblasts monolayer were examined for their diameter outgrowth and the NADH-CoQ reductase activity. The results showed that the hatching rate, the trophoblast outgrowth diameter and the activity of NADH-CoQ reductase of blastocysts collected from productive mice were significantly higher than those collected from the aging mice ($P < 0,05$). It can be concluded that the impairment of blastocysts implantation especially, in aging mice were caused by the low activity of the NADH-CoQ reductase that play important role in energy production needed for the hatching and trophoblast outgrowth.

Keywords: aging mice, implantation, trophoblast cells, hatching, NADH- CoQ R

PENDAHULUAN

Faktor umur (usia) merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kegiatan reproduksi. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pada tikus dan mencit tua terjadi penurunan fertilitas, jumlah dan kualitas embrio yang dihasilkan, kemampuan embrio untuk berkembang mencapai blastosis, serta kegagalan implantasi, bahkan tingkat kelahiran anak (Day *et al.*, 1991; Sunarti *et al.*, 2001; Acton *et al.*, 2004). Dalam perkembangannya, ada kalanya embrio praimplantasi mengalami gangguan, sehingga tidak semua embrio praimplantasi dapat mengalami *hatching* (menetas, keluar dari zona pellucida) dan implantasi yakni proses perlekatan dan infiltrasi, bahkan adakalanya disertai invasi sel-sel trofoblas kedalam selaput endometrium induk.

Kegagalan ini menyebabkan embrio tidak dapat berkontak dengan endometrium sehingga implantasi dan kebuntingan tidak terjadi (Horse *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2004).

Selain faktor usia tua (*aging*), adanya gangguan pada organel sel, khususnya mitokondria yang memegang peranan penting didalam proses pembentukan energi dapat mempengaruhi terjadinya kegagalan *hatching* dan implantasi blastosis (Tsuzuki *et al.*, 2001; John, 2002; Tamassia *et al.*, 2004). Embrio tahap blastosis terdiri dari *inner cell mass* (ICM) yang akan menjadi fetus, blastosul serta lapisan epitel paling luar yang disebut trofoblas yang akan berperan dalam proses implantasi dan akan menjadi selaput ekstraembrionik. Setelah blastosis mengalami *hatching*, sel-sel trofoblas akan mengalami proliferasi (pertumbuhan) dan diferensiasi menjadi berbagai tipe sel yakni giant

trofoblas, spongiotrofoblas, sel-sel glikogen dan sel syncytio trophoblast (Frendo *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2005).

Selama perkembangan embrio pra-implantasi dari zigot sampai mencapai blastosis, terjadi peningkatan aktivitas metabolisme serta kebutuhan energi (Trimarchi *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2001; Blerkom, 2004). Proses pembentukan energi sangat berhubungan erat dengan aktivitas mitokondria sebagai organel pembangkit energi di dalam sel (*cell power house*) sehingga gangguan atau rusaknya mitokondria dapat mempengaruhi proses pembentukan energi yang sangat dibutuhkan dalam proses *hatching* dan implantasi blastosis. Didalam mitokondria pembentukan energi berupa adenosin trifosfat (ATP) terjadi melalui dua interaksi siklus metabolisme, yaitu siklus asam sitrat (siklus kreb's) dan fosforilasi oksidasi (Klobuear dan Gorup, 2004; Brookes, 2004). Salah satu produk dari siklus asam sitrat adalah *nicotinamide adenin dinucleotide dehydrogenase* (NADH) yang berfungsi sebagai substrat pada reaksi transduksi energi dalam sistem rantai transpor elektron (RTE) atau fosforilasi oksidasi. Pelepasan energi NADH terjadi secara bertahap dengan melibatkan enzim-enzim antara lain *NADH-CoQ reductase* pada kompleks I (Trimarchi *et al.*, 2000; Dimauro dan Schon, 2003; Blerkom, 2004). Navarro dan Boveris (2007) membuktikan bahwa pada mencit *aging* terjadi penurunan aktivitas enzim pada kompleks I dan IV dari mitokondria.

Walaupun kajian dan informasi terhadap proses implantasi secara *in vitro* telah banyak dilaporkan, namun kajian *in vitro* mengenai kegagalan *hatching* dan implantasi yang dikaitkan dengan kemampuan mitokondria menghasilkan energi dan faktor umur tua (*aging*) terhadap pertumbuhan sel-sel trofoblas belum dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan memperoleh informasi mengenai: (1) tingkat *hatching* blastosis, serta (2) kemampuan pertumbuhan (*outgrowth*) dan (3) aktivitas *NADH-CoQ reductase* mitokondria sel-sel trofoblas dari blastosis mencit usia tua dan muda dalam sistem *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi dasar mengenai pengaruh faktor usia terhadap aktivitas *NADH-CoQ reductase* mitokondria serta kemampuan sel-sel trofoblas untuk tumbuh dan berdiferensiasi terhadap kegagalan *hatching* dan implantasi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Embriologi dan Laboratorium Histologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi serta Unit Pelaksana Teknis (UPT) Hewan Laboratorium, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Dramaga Bogor.

Rancangan Percobaan

Blastosis mencit dibagi kedalam dua perlakuan, yaitu: (1) blastosis dari induk mencit umur muda (2-3 bulan) dan (2) blastosis dari induk mencit tua (12 bulan keatas). Masing-masing kelompok dikultur sampai membentuk monolayer selama 10 hari, selanjutnya diukur pertumbuhan sel-sel trofoblas (*outgrowth*) dan aktivitas *NADH-CoQ reductase* secara histokimia. Masing-masing perlakuan menggunakan 10 embrio.

Koleksi Blastosis

Mencit putih (*Mus musculus albino*) betina umur muda (2 bulan) dan umur tua (12 bulan keatas) strain DDY disuperovulasi dengan penyuntikan hormon *pregnant mare's serum gonadotrophin* (PMSG, Folligon®, Intervet, Netherland) dengan dosis 5 IU/ekor dan 46 jam kemudian disuntik dengan hormon *human chorionic gonadotrophin* (hCG, Chorulon®, Intervet, Netherland) (dengan dosis yang sama) secara intraperitoneal (i.p.). Setelah penyuntikan hCG, mencit betina dikawinkan dengan pejantan dengan perbandingan jantan : betina 1:1. Mencit betina yang telah dikawini pejantan dicirikan oleh adanya sumbat vagina (masa perkejuan berwarna putih kekuningan di dalam lumen vagina) pada 18 jam pasca hCG dan dianggap sebagai hari pertama kebuntingan. Mencit betina dimatikan 96-98 jam pasca hCG dengan cara *dislocatio cervicalis*. Blastosis diperoleh dengan cara membilas kedua tanduk rahim dengan menggunakan spuit 1 cc yang berisi medium *Modified Phosphate Buffered Saline* (mPBS). Selanjutnya embrio dicuci sebanyak tiga kali di dalam larutan mPBS (Hogan *et al.*, 1994).

Kultur (Biakan) Blastosis Secara *In Vitro*

Blastosis yang terkoleksi dimasukkan ke dalam 20 µl medium tetes pada cawan petri steril yang ditutupi dengan *mineral oil*. Medium

kultur yang dipakai adalah *Tissue Culture Medium* (TCM 199 Gibco-BRL) yang diberi gentamicin 50 µg/ml medium, *New Born Calf Serum* (NBCS) 20%. Proses kultur dilakukan di dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% pada suhu 37°C sampai blastosis mengalami *hatching*. Kultur selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *Dubellco's Modified Eagles' Medium* (DMEM Gibco-BRL) yang ditambahkan 50µg/ml gentamicin, NBCS 20%, 1µl/ml ITS (kandungan insulin 5mg/ml, tranferin 10mg/ml, selenium 5mg/ml; Sigma St Louis USA) dan β-mercaptoethanol 14,3 mM (Sigma St Louis USA). Blastosis dikultur selama 10 hari sampai sel-sel trofoblas membentuk monolayer (selapis sel).

Pengukuran Pertumbuhan (*Outgrowth*) Sel-Sel Trofoblas

Sel-sel trofoblas dalam medium kultur *in vitro* akan tumbuh dan melakukan penjuruan ke arah eksternal yang diistilahkan dengan *outgrowth*. Pengukuran areal *outgrowth* sel-sel trofoblas menggunakan *eyespiece micrometer* dengan mengukur panjang pertumbuhan sel-sel trofoblas mulai dari batas luar ICM sampai batas luar sel trofoblas dibawah mikroskop inverted cahaya.

Aktivitas NADH-CoQ Reductase dengan Pewarnaan Histokimia

Aktivitas NADH-CoQ reductase dideteksi dengan pewarnaan histokimia yang dilihat dari aktivitas NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR) berdasarkan metode Malik *et al* (2000) dengan modifikasi. Monolayer sel-sel blastosis diinkubasi pada suhu 37°C, dalam campuran pereaksi yang terdiri dari: 0,2 mol/L bufer fosfat (pH 7,4) yang mengandung 0,1 mol/L sodium laktat, 0,1% laktat dehydrogenase (LDH; Boehringer Mannheim), 0,5 mg/ml NAD (Boehringer Mannheim) dan 0,5 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT; Boehringer Mannheim), selama 60 menit dalam suasana gelap. Reaksi

enzim NADH-tetrazolium reductase dihentikan dengan mencuci kultur monolayer sel dengan bufer fosfat 0,05 mol/L. NADH-TR akan mengubah NBT yang tidak berwarna menjadi produk reduksi yang berwarna biru. Penilaian aktivitas NADH-TR dilakukan berdasarkan pengamatan intensitas warna biru dari nitroblue tetrazolium pada sel-sel trofoblas yakni: (1) biru tua, (2) biru, (3) biru muda, dan (4) tidak berwarna biru. Warna biru tua yang ditimbulkan menggambarkan bahwa fungsi mitokondria pada sistem transpor elektron dalam kondisi sangat baik. Bila tidak atau sangat sedikit menghasilkan warna biru menggambarkan adanya gangguan atau disfungsi pada mitokondria terutama pada sistem transpor elektron khususnya kompleks I (NADH-CoQ reductase) dalam membentuk energi.

Analisis Data

Data tingkat *hatching* blastosis dari mencit usia tua dan muda serta data pertumbuhan sel-sel trofoblas diuji dengan analisis keragaman dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menggunakan *software Statistic Analyses System* (SAS 2000). Sedangkan data aktivitas NADH-CoQ reductase diuji dengan menggunakan metode Kruskal-Wallis dengan uji lanjut Multiple Comparison of Mean Ranks.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat *Hatching* Blastosis dari Induk Muda dan Tua (*Aging*)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa persentase blastosis yang mampu *hatching* pada kelompok umur muda (63%) secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok umur tua (33%). Hal ini juga didukung oleh data tingkat abnormalitas morfologi blastosis pada kelompok umur tua (52%) lebih tinggi dibandingkan umur muda (23%) (Tabel 1).

Tabel 1. Keadaan morfologi dan tingkat *hatching* blastosis mencit umur tua dan muda

Umur induk (bulan)	Jumlah blastosis	Morfologi normal (%)	Morfologi abnormal (%)	Tingkat <i>hatching</i> (%)	Gagal <i>hatching</i> (%)
Muda (2-3)	189	145 (77)	44 (23)	91 (63) ^a	54 (37) ^a
Tua (≥12)	63	30 (48)	33 (52)	10 (33) ^b	20 (67) ^b

Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0.05).

Berdasarkan hasil tersebut diatas nampak bahwa faktor umur mempengaruhi morfologi dan perkembangan embrio. Dengan semakin meningkatnya umur induk terjadi penurunan jumlah dan kualitas oosit, bahkan jumlah oosit yang mengalami apoptosis meningkat (Tarin *et al.* 2000; Collin *et al.* 2005) yang mengindikasikan semakin berkurangnya kemampuan repro-duksi. Dengan semakin meningkatnya umur induk, dilaporkan pula terjadinya kelainan kromosom yang dapat mengakibatkan abnormalitas embrio bahkan atau malformasi pada fetus (Collin *et al.* 2005).

Persentase blastosis normal yang mengalami *hatching* pada kelompok umur tua secara nyata lebih rendah dibandingkan dengan umur muda. Kegagalan *hatching* antara lain dapat disebabkan oleh adanya gangguan aktivitas mitokondria sebagai organel pembangkit energi yang dibutuhkan untuk proses *hatching*.

Outgrowth Sel-Sel Trofoblas Blastosis dari Induk Muda dan Tua

Pada saat implantasi, blastosis akan mengalami serangkaian kejadian yakni *hatching*, adesi dan perlekatan sel-sel trofoblas ke dinding endometrium, proliferasi, diferensiasi, infiltrasi, dan invasi sel-sel trofoblas ke dalam endometrium. Dalam lingkungan *in vitro* (kultur di dalam cawan petri), tidak semua

kejadian tersebut terjadi tetapi terbatas pada proses *hatching*, adesi, perlekatan yang diikuti dengan pertumbuhan (*outgrowth*) dan diferensiasi sel-sel trofoblas. *Outgrowth* dan diferensiasi sel-sel trofoblas tersebut dapat dianalogkan dengan proses invasi secara *in vivo*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan pertumbuhan sel-sel trofoblas dari mencit umur tua lebih rendah (223.5 ± 140) dibanding dengan pertumbuhan sel-sel trofoblas dari mencit umur muda yaitu 487.7 ± 291 (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa faktor umur mempengaruhi kemampuan pertumbuhan sel-sel trofoblas yang berperan penting dalam proses implantasi embrio.

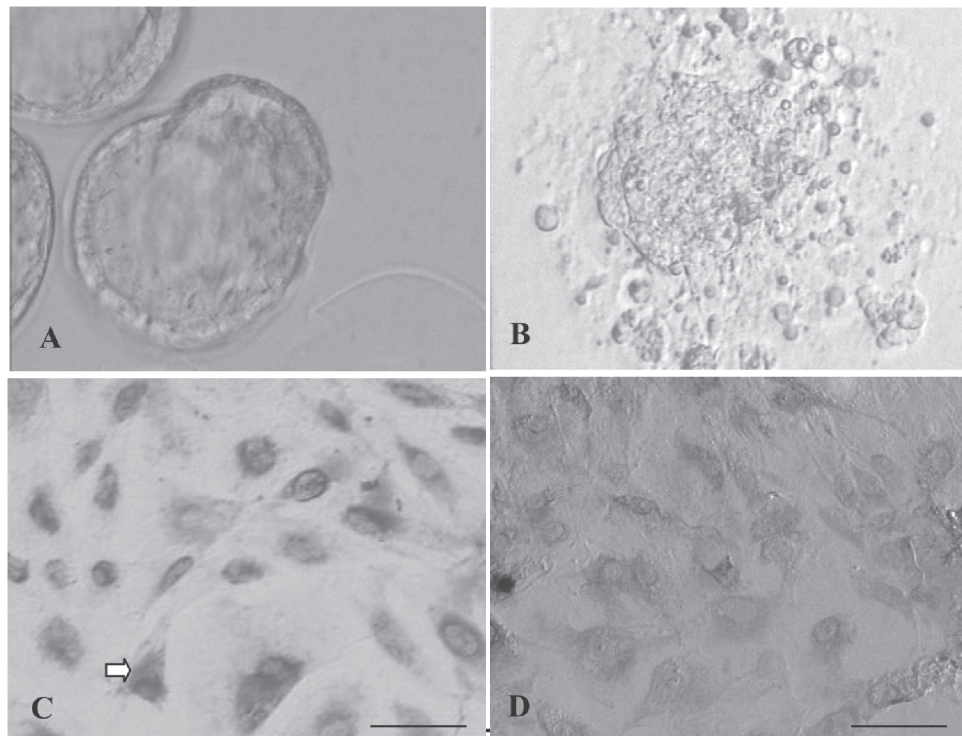
Diameter *outgrowth* yang rendah pada kelompok umur tua menunjukkan kemampuan pertumbuhan sel-sel trofoblas yang rendah. Untuk dapat berinvasi ke dalam endometrium dan membentuk hubungan antara maternal dan fetus, sel-sel trofoblas perlu melakukan proliferasi (pertumbuhan). Karenanya kegagalan atau terhambatnya proses pertumbuhan dan invasi sel-sel trofoblas dapat mengakibatkan kegagalan implantasi. Proses pertumbuhan dan perkembangan membutuhkan energi yang tinggi yang dihasilkan oleh mitokondria. Karenanya diduga terjadi penurunan fungsi mitokondria dalam menghasilkan energi yang dibutuhkan untuk proses *hatching* dan pertumbuhan sel-sel trofoblas.

Tabel 2 Diameter *outgrowth* sel-sel trofoblas dari mencit umur muda dan tua

Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Tabel 3. Aktivitas enzim *NADH Co Q reductase* sel-sel trofoblas blastosis dari induk umur muda dan tua.

Keterangan: 3 = biru tua (aktivitas enzim tinggi); 2 = biru sedang (aktivitas enzim sedang); 1 = biru muda (aktivitas enzim rendah) dan 0=tidak berwarna (tidak ada aktivitas enzim). *Superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).



Gambar 1. Aktivitas sel-seltrofoblast blastosis. (A) Blastosis *hatching*; (B) *Outgrowth* monolayer sel-sel trofoblast; (C-D) Pewarnaan histokimia NADH- tetrazolium reduktase pada monolayer sel-sel trofoblas: (C) pada blastosis mencit umur muda dengan intensitas biru tua dan (D) mencit umur tua dengan intensitas biru muda. Garis skala: 100 μ m.

Aktivitas NADH-CoQ Reductase Sel-Sel Trofoblas Mencit Umur Muda dan Tua

Berdasarkan intensitas warna, sel-sel trofoblas pada semua blastosis mencit umur muda menunjukkan intensitas warna biru tua (3,0) yang mengindikasikan tingginya aktivitas NADH-CoQ reductase; sedangkan pada mencit umur tua menunjukkan intensitas warna biru yang bervariasi dengan intensitas rata-rata adalah rendah (1,0) yang mengindikasikan bahwa aktivitas NADH-CoQ reductase rendah (Tabel 3 dan Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa pada blastosis dari induk umur tua terjadi penurunan aktivitas mitokondria dalam menghasilkan energi atau ATP; dan hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Navarro dan Boveris (2007) yang melaporkan bahwa terjadi penurunan aktivitas enzim *NADH-CoQ reductase* pada sel-sel organ tubuh dari mencit *aging*.

Sistem transpor elektron merupakan penghasil energi paling banyak dibanding metabolisme lainnya. Dalam menjalankan fungsinya sistem ini menggunakan substrat, salah satunya adalah NADH. Substrat ini masuk pada kompleks I transpor elektron secara bertahap dengan melibatkan enzim-enzim

antara lain NADH-CoQ reductase. Oleh sebab itu jumlah energi yang dihasilkan oleh mitokondria sangat tergantung pada aktivitas enzim NADH-CoQ reductase. Adanya gangguan pada mitokondria pada komponen kunci rantai transpor elektron seperti NADH-CoQ reductase pada kompleks I dapat mengakibatkan terganggu atau tidak terbentuknya elektron sehingga ATP tidak dapat dihasilkan dengan efisien dan dapat mengganggu fisiologis sel.

Kegagalan mitokondria diketahui berkaitan dengan penyakit degeneratif dan ketuaan. Kegagalan ini diakibatkan oleh tingginya radikal bebas dan akumulasi mutasi DNA yang dapat merusak DNA mitokondria sehingga terjadi penurunan fungsi mitokondria yang berperan sebagai tempat penghasil energi atau ATP, serta mengontrol pH intraseluler dan homeostasis kalsium dalam sel (Blerkom 2004; Acton *et al.* 2004). Patofisiologis mitokondria merupakan marka sitoplasmik sel pada proses degeneratif *aging* (Thouas *et al.* 2005). Terganggunya fisiologis sel dapat mengakibatkan sel mengalami lisis atau apoptosis sehingga sel tidak dapat tumbuh dan berdiferensiasi ke proses selanjutnya (Dimauro dan Schon 2003; Klobuear dan Gorup 2004; Blerkom 2004).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tingkat *hatching* serta pertumbuhan dan aktivitas NADH-CoQ reductase sel-sel trofoblas blastosis dari induk umur muda lebih tinggi dibandingkan induk umur tua. Rendahnya aktivitas NADH-CoQ reductase sel-sel trofoblas berkaitan erat dengan kegagalan *hatching* serta rendahnya kemampuan pertumbuhan (*outgrowth*) sel-sel trofoblas yang selanjutnya dapat berdampak pada kegagalan implantasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Acton BM, Jurisicova A, Jurisica I, Casper RF. 2004. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod* 10 (1) : 23-32.
- Blerkom JV. 2004. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ion regulation and developmental competence. *Reproduction* 128: 269-280.
- Brookes PS *et al.* 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-C833.
- Collin *et al.* 2005. ESHRE capri workshop group: Fertility and ageing. *Human Reproduction*. 11(3): 261–276.
- Day JR, Lapolt PS, Morales TH, and Lu JKH. 1991. Plasma pattern prolactin, progesteron, and estradiol during early pregnancy in aging rats: relation to embryonic development. *Biol. Reprod.* 44:786-790.
- Dey SK *et al.* 2004. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews* 25(3): 341-373.
- Dimauro S, Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain disease. *The N Engl J Med* 348 (26): 2656-2668.
- Dominguez F, Yan'ez-Mo M, Madrid SF, Simón C. 2005. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?. *The FASEB Journal* 19.
- Fong CY *et al.* 2001. Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocysts: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Hum Reprod* 16(3): 540-546.
- Frendo FL *et al.* 2003. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol.* 23(10): 3566–3574.
- Hashash AHK El, Kimber SJ. 2004. Trophoblast differentiation in vitro: establishment and Characterisation of a Serum-Free Culture Model for Murine Secondary Trophoblast Giant Cells. *Reproduction* 128:53-71
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.* 2nd Ed. New York USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Horse KR *et al.* 2004. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface *J. Clin. Invest.* 114:744-754.
- John JC. 2002. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. *Theriogenology* 57:109-123.
- Klobear NK, Gorup M. 2004. Histochemical investigations of NADPH-and NADH-tetrazolium reductase Activity in the Liver of Selenium and Copper Treated Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarski Arhiv* 74 (5): 331-340
- Ludwig TE, Squirrell JM, Palmenberg AC, Bavister BD. 2001. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate1. *Biol Reprod* 65: 1648–1654.
- Malik S, Sudoyo H, Marzuki S. 2000. Microphotometric analysis of NADH-tetrazolium reductase deficiency in fibroblast of patients with leber hereditary optic neuropathy. *J Inherit Metab Dis.* 23:730-744.
- Navarro A, Boveris A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C670–C686.
- Sunarti, Djuwita I, dan Sukra Y. 2000. Pengaruh Umur Induk Mencit terhadap Perkembangan Embrio secara *In Vitro* pada mencit Superovulasi. *Media Veteriner.* 7(4):18-21.
- Tamassia *et al.* 2004. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod* 71:697–704.
- Tarin JJ, Albala SP, Cano S. 2000. Consequence on offspring abnormal function in ageing gamet. *Hum Reprod.* 6(6):532-549.
- Thouas GA, Trounson AO, Jones JM. 2005. Effect of Female Age on Mouse Oocyte Developmental Competence Following Mitochondrial Injury. *Biol. Reprod.* 73, 366–373.
- Trimachi RJ *et al.* 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62: 1866-1874.
- Tsuzuki Y, Hisanaga M, Ashizawa K, Fujihara N. 2001. The effect of dimethyl – sulfoxide and sucrose as a cryoprotectant on the adenosine triphosphate and ultrastructure of bovine oocytes mature in vitro. *J.Anim. Sci.* 14 (10): 1353-1359.