

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Embriologi dan Laboratorium Histologi, Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2003 sampai bulan Agustus 2003.

3.2. Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus albinus*) betina strain DDY yang berumur 4 minggu. Mencit dipelihara dalam kandang plastik yang diberi alas sekam dan ditutup dengan kawat. Pakan dan air minum diberikan *ad libitum*.

3.3. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: NaCl fisiologis 0,9%, PMSG, xylazin, ketamin, asam pikrat jenuh, formaldehid, asam asetat, alkohol, xylol dan parafin.

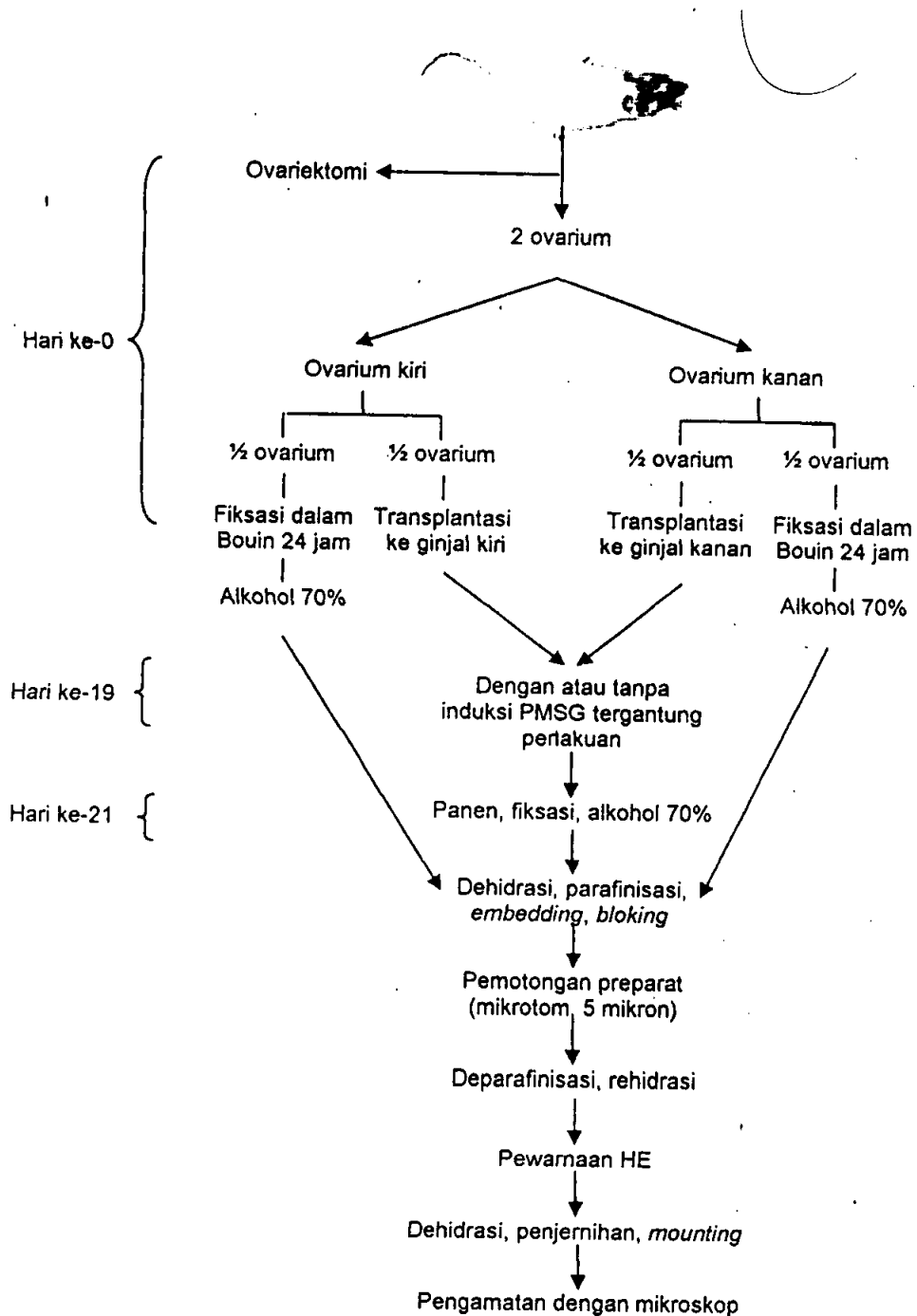
Peralatan yang digunakan adalah spuit 1cc, gunting, pinset, *scalpel*, tang arteri, jarum, benang jahit, *needle holder*, mikroskop, gelas objek, gelas penutup, cawan petri dan mikrotom.

3.4. Prosedur Kerja

Penelitian ini menggunakan 10 ekor mencit betina yaitu 5 ekor untuk perlakuan induksi dengan PMSG dan 5 ekor mencit untuk perlakuan tanpa induksi PMSG. Diagram alur dari penelitian ini selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.

3.4.1. Autotransplantasi Ovarium di Subkapsula Ginjal

Autotransplantasi ovarium mencit di subkapsula ginjal dilakukan seperti yang dilaporkan oleh Mohamad *et al.* (2004). Mencit terlebih dahulu dibius menggunakan 0,3 mg xylazin (0,03 ml) per ekor secara intraperitoneal dan 1,5 mg ketamin (0,03 ml) secara intramuskular. Setelah dibius,



Gambar 2. Diagram alur prosedur penelitian

rambut disekitar punggung dicukur, kulit dan dinding peritonium di daerah *flank* dan otot di atas ginjal disayat $\pm 1-1,5$ cm, ovarium dikeluarkan lalu dilakukan ovariectomi. Selanjutnya ginjal dikeluarkan dengan cara menekan bagian ventral abdomen sehingga ginjal keluar melalui bidang sayatan dan berada di luar rongga abdomen. Kapsula ginjal dicubit dengan pinset tajam kemudian dibuat sayatan sebesar ovarium yang akan dimasukkan tanpa melukai bagian kortek ginjal. Ovarium kemudian dibersihkan dengan cairan NaCl fisiologis dan dipotong

dua, satu potongan masing-masing ditransplantasikan ke subkapsular ginjal pada sisi yang sama dimana permukaan ovarium yang disayat diusahakan melekat pada permukaan kortek ginjal dan belahan lain difiksasi untuk pengamatan histologi. Setelah potongan ovarium berada di bawah kapsula ginjal, ovarium didorong menggunakan pinset yang tumpul menjauhi daerah sayatan untuk menghindari ovarium keluar kembali dari kapsula ginjal. Selanjutnya ginjal dikembalikan ke rongga abdomen, dinding abdomen dan kulit dijahit terpisah dan bekas sayatan diberi antibiotik (Nebacetin, PHAROS, Jakarta) untuk persembuhan.

3.4.2. Induksi PMSG

Mencit yang telah mengalami autotransplantasi ovarium di subkapsula ginjal dibagi ke dalam dua kelompok. Lima ekor mencit disuntik PMSG 5 IU/ekor untuk kelompok PMSG⁽⁺⁾ secara intraperitoneal pada hari ke-19 pasca transplantasi pada jam 12.00 WIB dan lima ekor lainnya tidak disuntik PMSG untuk kelompok PMSG⁽⁻⁾. Empat puluh delapan jam (hari ke-21 pasca transplantasi) kemudian semua mencit dimatikan, kemudian ovarium yang telah ditransplantasikan diambil bersama ginjalnya, lalu difiksasi dalam larutan Bouin (asam pikrat jenuh : formaldehid : asam asetat = 15 : 5 : 1) selama 24 jam. Kemudian larutan Bouin diganti dengan alkohol 70% sebanyak tiga kali dan disimpan sampai proses histologi dilakukan.

3.4.3. Histologi

Prosedur histologi dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan oleh Kirenan (1990). Jaringan ovarium yang telah disimpan dalam alkohol 70%, dimasukkan ke dalam alkohol 80% selama satu hari, selanjutnya alkohol 90%, alkohol 95% selama setengah hari berikutnya dimasukkan ke dalam alkohol 100% I, II, III dengan waktu masing-masing \pm 1-2 jam untuk proses dehidrasi. Kemudian jaringan ovarium dimasukkan ke dalam xylol I, II, III dengan waktu masing-masing \pm ½ jam untuk proses penjernihan lalu ke dalam parafin I, II, III dengan waktu masing-masing \pm ½ jam untuk *embedding*. *Bloking* parafin dilakukan pada suhu kurang dari 65° C, dengan tahapan wadah alumunium dilapisi dengan vaselin lalu diisi dengan parafin, ovarium diletakkan di dasar wadah, kemudian wadah tadi didinginkan dengan cara dicelupkan dalam air secara perlahan sampai beku dan disimpan dalam lemari es agar proses

pembekuannya sempurna. Blok parafin yang berisi jaringan dipotong di ruang dingin secara serial menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron dan hasil potongan tersebut dimasukan ke dalam air hangat kira-kira 40° C dan ditempelkan ke objek gelas lalu dikeringkan di atas pemanas dan disimpan dalam inkubator 42° C selama 1 hari. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) dilakukan dengan tahapan defarapinisasi-rehidrasi (Xylol III, II, I, alkohol 100% III, II, I, alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol 80% dan alkohol 70%) masing-masing selama 1-2 menit, lalu dimasukan dalam air kran ± 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam aquades selama 3-5 menit dan dilanjutkan dengan pewarnaan hematoksilin yang bertujuan untuk mewarnai inti selama 45 detik. Tahapan selanjutnya preparat dimasukan kembali ke dalam air mengalir selama 10 menit dan ke dalam aquades selama 3-5 menit. Preparat diwarnai dengan eosin selama ± 1,5 menit untuk mewarnai sitoplasma. Pemucatan warna eosin (diferensiasi) sekaligus dehidrasi dilakukan dengan alkohol, penjernihan dengan xylol dan *mounting* menggunakan entelan. Lalu preparat ditutup dengan menggunakan gelas penutup.

3.5. Evaluasi dan Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali untuk melihat folikel primordial, primer, dan sekunder serta perbesaran 100 kali untuk melihat folikel tersier, de Graaf dan CL. Pengamatan folikel berdasarkan kriteria yang digunakan oleh Liu *et al.* (2000). Folikel primordial terdiri atas oosit yang dikelilingi satu lapis sel folikel berbentuk pipih, folikel primer terdiri atas oosit yang dikelilingi satu lapis sel folikel berbentuk kubus, folikel sekunder terdiri atas oosit yang dikelilingi dua lapis atau lebih sel folikel berbentuk kubus, folikel tersier dan de Graaf terdiri atas oosit yang dikelilingi sel folikel banyak lapis berbentuk kubus dan disertai antrum folikuli dan CL memiliki sel-sel lutein yang khas. Metode penghitungan dari tiap-tiap folikel berdasarkan modifikasi metode peneliti sebelumnya (Herviana 2003, Candy *et al.* 1997, Liu *et al.* 2002). Semua folikel dihitung pada setiap kelipatan lima dari potongan serial dan hasil penghitungan dikalikan dengan jumlah potongan seluruhnya dan faktor kelipatan untuk masing-masing folikel. Untuk menghitung faktor kelipatan, jumlah hitungan folikel tertentu dari lima belas sayatan serial dibagi dengan hitungan pada setiap kelipatan lima. Faktor kelipatan untuk folikel primordial dan primer = 5, folikel sekunder = 1,5, folikel tersier serta CL = 1.

Setiap folikel hanya dihitung satu kali yaitu pada saat teramati anak inti (nukleolus) oosit dari folikel yang bersangkutan atau ukuran terluas dari CL untuk menghindari penghitungan ganda.

3.6. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Penelitian ini disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan, kontrol sebelum transplan, dan transplantasi dengan atau tanpa induksi PMSG. Data morfologi folikel dijelaskan secara deskriptif dan jumlah folikel yang diperoleh berupa rata-rata jumlah folikel \pm standar deviasi dianalisis dengan menggunakan Uji t pada selang kepercayaan 95% atau $P < 0,05$.