

B A B III

MATERI DAN METODA

Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari tanggal 21 September 1990 sampai 7 Mei 1991. Kambing betina resipien dipelihara dikandang milik Laboratorium Produksi Ternak, sedangkan pelaksanaan pembedahan dalam rangka transfer embrio dilakukan di Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pengukuran kadar progesteron dilakukan di Makmal Endokrinologi RSUD Dr Soetomo/ Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

MATERI PENELITIAN

A. Perangkat peneraan radioimmunoassay.

Mikropipet otomatis merk SOCOREX Swiss ukuran 5-50 ml, vorstex, mikropipet merk STEPPEN 411 ukuran 500 ul, tabung ekstraksi, tabung kecil, Mixer merk VIBRAX, lembar aluminium (alluminium foil), minivial, Liquid Scilintation Counter.

B. Bahan Penelitian Radioimmunoassay.

Antigen berlabel ^{40kvm 125} tritium, CO2 padat, ether, aseton, Buffer steroid, antiserum progesteron, arang dextran, cairan sintilisasi, plasma darah kambing kacang.

C. Hewan Percobaan.

Dalam penelitian ini hewan percobaan yang dipakai adalah kambing kacang betina berumur 1,5 - 2 tahun, yang berasal dari pasar hewan Kotamadya Surabaya sebanyak 24 ekor. Kambing betina yang dipakai mempunyai kesehatan yang baik dan daya reproduksi normal. Semua kambing dalam percobaan ini diberi perlakuan sama baik makanan, pemeliharaan dan lingkungannya.

METODA PENELITIAN

Pengambilan sampel darah.

Sampel darah diambil melalui vena jugularis sebanyak 3 ml, ditampung didalam gelas hampa udara yang berisi heparin. Sampel darah yang diambil kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasmanya. Plasma yang dipermukaan tabung diisap dengan pipet Pasteur. Plasma yang diperoleh disimpan dalam freezer pada suhu -20 sampai -30 derajat Celcius sampai dilakukan peneraan hormon. Pengambilan sampel darah dilakukan tiga kali, pengambilan pertama sebelum penyuntikan PGF2 alpha sebagai kontrol, pengambilan ke dua pada 14 hari setelah transfer embrio dan pengambilan ke tiga 21 hari setelah transfer embrio.

Embrio Yang Akan Ditransfer.

Uterus kambing yang telah dipotong di Rumah Potong Hewan Kotamadya Surabaya yang mempunyai ovarium dengan korpus luteum berumur satu sampai enam hari diambil untuk dipakai sebagai sumber embrio. Uterus yang mempunyai korpus luteum umur satu sampai tiga hari digelontor (*flush*) dengan menggunakan cairan TCM 199 sebanyak 3 ml dari uterotubaljunction (UTJ) ke arah infundibulum yang ditampung dalam cawan petri. Uterus yang mempunyai korpus luteum berumur empat sampai enam hari digelontor dengan cairan TCM 199 sebanyak 10 ml dari uterotubaljunction ke arah kornua uteri. Cairan hasil pengglontoran diperiksa menggunakan mikroskop disekting untuk mendapatkan embrio. Selanjutnya embrio yang telah diperoleh dilakukan pemeriksaan terhadap bentuk normal dan abnormalnya menggunakan mikroskop sinar. Pada penelitian ini hanya embrio normal saja yang dipakai untuk ditransfer ke uterus resipien.

Sinkronisasi.

Persiapan Kambing betina sebagai resipien transfer.

Semua kambing betina resipien dilakukan dua kali penyuntikan PGF2 alpha (Enzaprost F) dengan dosis 6.5 mg tiap kali penyuntikan (Partodihardjo, 1982). Empat hari setelah penyuntikan PGF2 alpha yang ke dua, kemudian

dilakukan transfer embrio dengan pembedahan. Sebagai kontrol dilakukan pengukuran kadar progesteron dalam plasma pada semua kelompok kambing resipien sebelum dilakukan penyuntikan PGF2 alpha. Pada hari ke 14 dan ke 21 setelah transfer embrio diambil darahnya, untuk diukur kadar progesteron sebagai dasar penentuan ada tidaknya kebuntingan pada kambing resipien .

Tingkat Embrio Yang Ditransfer.

Semua kambing resipien dibagi secara acak menjadi empat kelompok masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor. Kelompok I mendapat transfer embrio pada tingkat dua sel, kelompok II embrio tingkat empat sel, kelompok III memperoleh embrio tingkat delapan sel dan kelompok IV memperoleh embrio tingkat lebih dari delapan sel. Disposisi embrio pada saluran alat kelamin dengan cara pembedahan. Semua embrio yang diperoleh ditransfer pada tuba falopii dari kambing resipien dengan cara pembedahan (laparotomy).

Pengukuran Kadar Progesteron dalam Serum Darah.

Sampel plasma darah setelah dikeluarkan dari freezer didiamkan pada suhu kamar kemudian disiapkan untuk dianalisis.

Menyiapkan tabung-tabung ekstraksi dan diberi tanda. Semua sampel plasma darah dibuat dua kali ulangan (duplo).

Pembuatan sediaan uji sampel progesteron adalah sebagai berikut:

1. Serum diambil 20 μ l dengan menggunakan mikropipet merk SOCOREX Swiss ukuran 5-50 μ l.
2. Ditambahkan eter sebanyak 1,5 ml dengan menggunakan pipet otomatis, kemudian dicampur dengan menggunakan vortex digoyang selama satu menit.
3. Tabung diletakkan diatas CO₂ padat sebelumnya telah diberi aceton agar lebih dingin, tujuannya adalah untuk memisahkan larutan progesteron dalam eter yang tidak membeku, sedang zat lainnya membeku.
4. Selanjutnya dengan cepat larutan ekstrak progesteron dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang lain.
5. Kemudian diuapkan selama satu malam sehingga terbentuk ekstrak kering progesteron.
6. Kedalam tabung ditambahkan 100 μ l antiserum progesteron mulai dari tabung Bo dan seterusnya (sedang tabung TC dan tabung NSB tidak diberi) dengan menggunakan pipet STEPPEN 411 kemudian di campur.
7. Ditambahkan antigen berlabel tritium pada semua tabung sebanyak 100 μ l menggunakan pipet STEPPEN 411 kemudian dicampur dengan menggunakan vortex.

8. Kemudian diinkubasi selama 24 jam.
9. Diberi dextran-charcoal 200 ul dan diinkubasi pada suhu 4 derajat Celcius selama 30 menit.
10. Disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm.
11. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung sintilasi dan ditambahkan cairan sintilisasi sebanyak 4 ml kemudian dikocok dengan tangan dan siap untuk dicacah dengan Liquid Scintillation Counter.

Membuat standart progesteron dilakukan sebagai berikut :

1. Satu ampul progesteron standart WHO dengan konsentrasi 2.5 ng/l dibagi kedalam empat tabung dengan volume sama , dari ke empat tabung tersebut hanya satu tabung saja yang dipakai sedang lainnya disimpan.
2. Tabung yang dipakai tersebut, disebut tabung 1, diencerkan dengan menambahkan 10 ml buffer steroid.
3. Dipanaskan 40 derajat Celcius selama 30 menit ; didinginkan pada suhu lebih-kurang empat derajat Celcius.
4. Diambil 2 ml larutan dari tabung 1 dipindahkan ke tabung 2, ditambah 2 ml buffer steroid, dicampur dan dikocok, didiamkan selama 2-3 menit.
5. Diambil dua ml larutan dari tabung 2 dipindahkan ke tabung 3, ditambahkan 2 ml buffer steroid, dicampur dan dikocok, di diamkan selama 2-3 menit.

6. Diambil 2 ml larutan dari tabung 3 dipindahkan ke tabung 4, ditambahkan 2 ml buffer steroid, dicampur dan dikocok, didiamkan selama 2-3 menit.
7. Diambil 2 ml larutan dari tabung 4 dipindahkan ke tabung 5, ditambahkan 2 ml buffer steroid, dicampur dan dikocok, didiamkan selama 2-3 menit.
8. Diambil dua ml larutan dari tabung 5 dipindahkan ke tabung 6, ditambahkan 2 ml buffer steroid, dicampur dan dikocok, didiamkan selama 2-3 menit.

Pengambilan Data :

Data yang akan diolah diambil dari hasil peneraan progesteron plasma dengan teknik *radioimmunoassay* fase cair memakai alat *Liquid Scintillation Counter*.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data :

Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak lengkap dan data yang diperoleh disajikan secara diskriptif serta dilakukan analisis statistik dengan uji *ki-kuadrat*.