

# SKRIPSI

## PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA (ZP3) KAMBING SECARA SUB KUTAN TERHADAP TEBAL DAN GAMBARAN HISTOLOGI DINDING UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) BETINA



Oleh

**KUSHENDARINI**  
**SURABAYA-JAWA TIMUR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**  
**2002**

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA  
(ZP3) KAMBING SECARA SUB KUTAN TERHADAP  
TEBAL DAN GAMBARAN HISTOLOGIS DINDING  
UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) BETINA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

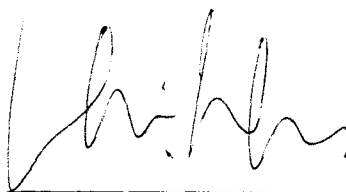
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh:

**Kushendarini**  
**NIM 069612284**

Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Budiarto M.P., Drh)  
Pembimbing Pertama



(Dr. Bambang Sektiari L., DEA, Drh)  
Pembimbing Kedua

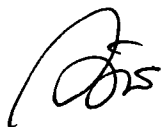
Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Mengetahui  
Panitia Penguji,



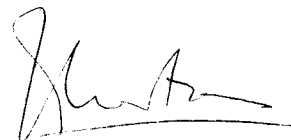
Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh

Ketua



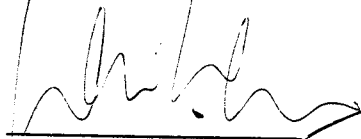
E. Bimo Aksono H.P., M.Kes., Drh

Sekretaris



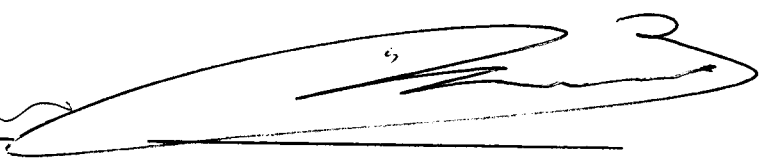
Eka Pramyrtta, M.Kes., Drh

Anggota



Budiarto M.P., Drh

Anggota



Dr. Bambang Sektiari L., DEA, Drh

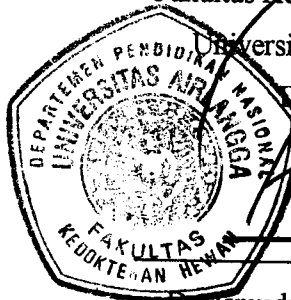
Anggota

Surabaya, 19 Juli 2002

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Dr. Ismudiono M.S., Drh

NIP. 130687297

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA  
(ZP3) KAMBING SECARA SUB KUTAN TERHADAP  
TEBAL DAN GAMBARAN HISTOLOGIS DINDING  
UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) BETINA**

Kushendarini

**ABSTRAK**

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap tebal dan gambaran histologis uterus mencit (*Mus musculus*) betina.

Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor mencit betina strain Balb-G berumur 2 sampai 3 bulan dengan berat badan 20-30 g. Rancangan percobaan yang digunakan ialah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 8 ulangan. Pada penyuntikan pertama dan booster, mencit betina disuntik dengan 0,05 suspensi zona pelusida (Zp3) kambing dalam 0,05 ml Complete Freund Adjuvant/ Incomplete Freund Adjuvant dengan dosis 20 µg dan 40 µg (P1 dan P2). Sedangkan kontrol diberi 0,1 ml NaCl fisiologis. Booster dilakukan setelah 14 dan 21 hari. Data yang diperoleh dari tebal dinding uterus diuji dengan ANAVA sedangkan untuk gambaran histologis menggunakan uji Kruskal Wallis.

Setelah 24 hari dari booster yang kedua, mencit dibedah dan uterusnya diambil untuk dibuat sediaan histologi.

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan baik dari ketebalan maupun gambaran histologis uterus ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan tidak menyebabkan penebalan dinding uterus dan perubahan gambaran histologis.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT yang telah memberikan karunia dan rahmat-NYA sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Secara Subkutan Terhadap Tebal Dan Gambaran Histologis Dinding Uterus Mencit (*Mus musculus*) Betina.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang membantu penulis dalam melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi, antara lain:

1. Bapak Dr. Ismudiono M.S., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan penulis untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Bapak Budiarto M.P., Drh. selaku dosen pembimbing pertama, Bapak Dr. Bambang Sektiari L., DEA, Drh. selaku dosen pembimbing kedua, yang telah bersedia memberikan saran, nasehat, dan bimbingan yang berguna dalam penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Imam Mustofa M.Kes., Drh., Ibu Aulanni'am DEA, Drh., Ibu Dra Mahriani yang telah bersedia memberikan saran dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian.

Terima kasih penulis ucapkan pada Ibu, Bapak, Mbak Arti, Sasi, Tito, Bapak dan Ibu Isdarnoko beserta keluarga besar Mulyorejo, Mas Piyu, Bang

Hakeem, Yayang (Kimi o ai shiteru), Mike Shinoda (Chubby), Cak Mozart, Ninis, Nana, Rulli NT dan Popo yang telah memberikan dorongan dan semangat dengan segenap cinta kasih.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada teman-teman penelitian penulis (Dite, Dian, Ismau, Bayu dan Yuli), teman-teman angkatan '96, keluarga besar KMVP Pet and Wild Animal dan teman-teman UKM Bola Basket Unair yang telah memberikan bantuan, kritik dan saran selama penulis menyusun skripsi ini.

Akhir kata penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Walaupun demikian, semoga hasil-hasil yang dituangkan dalam penelitian ini bermanfaat bagi pengetahuan terutama untuk menunjang progam KB.

Surabaya, Maret 2003

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Landasan Teori.....	2
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
1.6. Hipotesis Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Alat-alat Reproduksi Betina.....	5
2.2. Uterus.....	6
2.3. Zona Pelusida.....	7
2.4. Antigen dan Imunogen.....	8
2.5. Antibodi.....	8
2.6. Respon Imun.....	9
2.7. Kontrasepsi.....	10
2.8. Imunokonstrasepsi.....	12

BAB III. MATERI DAN METODE.....	14
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2. Bahan dan Materi Penelitian.....	14
3.2.1. Hewan Percobaan.....	14
3.2.2. Bahan Penelitian.....	15
3.3.3. Alat-alat Yang Digunakan.....	15
3.3. Metode Penelitian.....	15
3.3.1. Pengumpulan Oosit Invitro.....	15
3.3.2. Preparasi Zona Pelusida.....	15
3.3.3. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida.....	16
3.3.4. Perlakuan Terhadap Hewan Coba.....	17
3.3.5. Pembuatan sediaan Histologi.....	17
3.4. Peubah Yang Diamati.....	17
3.5. Rancangan Percobaan dan Analisis Data.....	18
3.5.1. Rancangan Penelitian.....	18
3.5.2. Analisis Data.....	18
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	19
4.1. Tebal Dinding Uterus Mencit.....	19
4.2. Gambaran Histologis Dinding Uterus Mencit.....	20
BAB V. PEMBAHASAN.....	24
5.1. Tebal Dinding Uterus Mencit.....	24
5.2. Gambaran Histologis Dinding Uterus Mencit.....	25



BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	28
6.1 Kesimpulan.....	28
6.2. Saran.....	28
RINGKASAN.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	35

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Nilai Rata-rata dan Simpangan Baku Tebal Dinding Uterus Mencit.....	19
2. Hasil Skor Histopatologis Dinding Uterus Mencit dari Ketiga Perlakuan.....	21

## DAFTAR GAMBAR.

	Halaman
1. Gambar Mikroskopis Dinding Uterus Mencit Betina Pada Kontrol (NaCl Fisiologis) dengan Perbesaran 200X. Semua Sel Masih Dalam Keadaan Normal.....	22
2. Gambar Mikroskopis Dinding Uterus Mencit Betina Pada Perlakuan 1 (20 $\mu$ g Suspensi Zp3) dengan Perbesaran 200X. Peningkatan Hiperplasi Seluruh Kelenjar dan Tebal Dinding Uterus Masih Dalam Keadaan Normal.....	22
3. Gambar Mikroskopis Dinding Uterus Mencit Betina Pada Perlakuan 2 (40 $\mu$ g Suspensi Zp3) dengan Perbesaran 200X. Peningkatan Hiperplasi Seluruh Kelenjar dan Tebal Dinding Uterus Masih Dalam Keadaan Normal.....	23

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Evaluasi Statistik Tebal Dinding Uterus Mencit.....	36
2. Tingkat Perubahan dan Skor Histologik Dinding Uterus Mencit yang Disuntik dengan 0,1 ml NaCl Fisiologis.....	38
3. Tingkat Perubahan dan Skor Histologik Dinding Uterus Mencit yang Disuntik dengan 0,1 ml Suspensi yang Mengandung 20 $\mu$ g Zp3 Kambing dalam CFA/IFA.....	39
4. Tingkat Perubahan dan Skor Histologik Dinding Uterus Mencit yang Disuntik dengan 0,1 ml Suspensi yang Mengandung 40 $\mu$ g Zp3 Kambing dalam CFA/IFA.....	40
5. Penilaian (Skor) Perubahan Histologis Dinding Uterus (Norris, 1983) Dikutip Oleh Prasetya (1997).....	41
6. Penentuan Peringkat (Rank) dan Analisis Data Histopatologis Dinding Uterus Mencit.....	42
7. Prosedur Pembuatan Sediaan Histologis Uterus.....	45
8. Proses SDS-PAGE ( <i>Sodium Duodecyl Sulfate Polyarilamide Gels Electrophoresis</i> ).....	48

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Perkembangan vaksin kontrasepsi yang efektif sangat berperan dalam pemecahan masalah pertumbuhan penduduk yang terkait dengan bidang agrikultur, kesehatan, ekonomi, dan sosial. Penelitian-penelitian telah dilakukan untuk mengembangkan vaksin imunokontrasepsi. Beberapa bahan yang potensial sebagai antigen untuk imunokontrasepsi antara lain sperma, zona pelusida (Zp), dan antigen hormonal (Feng *et al.*, 1999).

Imunisasi pada mamalia betina (dalam penelitian ini menggunakan *Macaca fascicularis*) dengan protein zona pelusida diketahui dapat menimbulkan infertilitas (Martinez and Harris, 2000). Antigen zona pelusida dapat bekerja ke target organ yaitu zona pelusida, tanpa ada kekawatiran gangguan atau bahaya pada kesehatan individu yang diimunisasi (Castle and Dean, 1996). Pada dasarnya Antigen Zona pelusida (Ag-Zp) dapat menimbulkan Ig G spesifik yang mampu memblokir pertautan spermatozoa di permukaan zona pelusida dengan cara mengubah bentuk reseptor spermatozoa dan mengadakan pengerasan konsistensi zona pelusida (Crightton, 1984).

Penelitian yang dilakukan selama ini sebagian besar menggunakan bahan baku zona pelusida babi atau *porcine Zona pellucida* (pZp). Menurut Hasegawa *et al.* (1991) zona pelusida babi dapat mengakibatkan hambatan atau meniadakan reaksi zona dengan spermatozoa pada manusia. Jika produk akhir penelitian itu

dipasarkan, maka akan timbul masalah sosial masyarakat muslim pada sebagian besar masyarakat Indonesia. Berdasarkan hal tersebut diatas maka perlu dilakukan penelitian menggunakan zona pelusida (Zp3) dari oosit hewan-hewan lain seperti sapi, kambing, atau domba sebagai bahan imunokontrasepsi yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku antifertilitas.

Menurut Yuniarti (2002) penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing menekan angka kebuntingan sampai 100 % dengan dosis tertinggi pada mencit betina dan mempengaruhi jumlah janin perkebuntingan pada hewan yang gagal mencapai infertilitas, oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruhnya pada organ reproduksi lainnya khususnya uterus.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas maka pada penelitian ini terdapat permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) secara sub kutan berpengaruh terhadap tebal dinding uterus mencit?
2. Apakah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) secara sub kutan berpengaruh terhadap gambaran histologis dinding uterus mencit?

## **1.3. Landasan Teori**

Zona pelusida ialah selubung ekstra seluler yang mengelilingi oosit pada mamalia. Zona pelusida mengandung oligosakarida dari glikoprotein yang merupakan faktor kunci pada interaksi antara oosit dengan spermatozoa (Talevi *et*

*al.*, 1997). Zona pelusida berperan dalam pengenalan awal pada perlekatan spermatozoa ke oosit dengan cara yang spesifik (Gupta *et al.*, 1997). Berat molekul glikoprotein zona pelusida adalah sekitar 200.000 D (Shimizu *et al.*, 1982). Agar dapat bersifat antigenik, molekul harus berukuran besar, kaku (mempunyai konfigurasi yang stabil), kimiawi kompleks dan asing. Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Hampir semua protein yang mempunyai berat molekul lebih besar dari 1.000 D adalah antigenik (Tizard, 1988). Sedangkan menurut Bellanti (1993) imunogen yang efektif mempunyai berat molekul lebih besar dari 10.000 D.

Menurut Wood *et al.* (1982) zona pelusida dengan molekul protein dan glikogen (glikoprotein) penyusun dapat bertindak sebagai imunogen yang merupakan bahan dasar dari pembuatan vaksin kontrasepsi pada wanita.

Zona pelusida mengandung tiga jenis glikoprotein yang spesifik secara biokimiawi yaitu Zp1, Zp2, Zp3 dimana Zp3 dikenali sebagai reseptor primer untuk spermatozoa pada proses interaksi gamet jantan dan betina (Gupta *et al.*, 1997). Penghilangan gen pembentuk Zp3 pada mencit mengakibatkan kegagalan proses fertilisasi karena tidak adanya reseptor spermatozoa sehingga mencit tersebut menjadi infertil (Rankin *et al.*, 1996, Rankin *et al.*, 2001).

Beberapa masalah yang perlu diteliti pada penggunaan imunokontraseptif ialah efek sampingnya, ketersediaan bahannya, dan kemungkinan terjadinya *incomplete reversibility* (Epifano and Dean, 1994).

Salah satu efek samping konterasepsi yang tidak dikehendaki adalah perubahan struktur histologis uterus.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan terhadap tebal uterus mencit.
2. Mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan terhadap gambaran histologis uterus mencit.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Diharapkan hasil penelitian ini memberi informasi tentang kemungkinan pemanfaatan zona pelusida (Zp3) kambing sebagai imunokontrasepsi pada hewan dan manusia.

#### **1.6. Hipotesis Penelitian**

Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan tidak berpengaruh terhadap tebal uterus mencit.
2. Penyuntikan zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan tidak berpengaruh terhadap gambaran histologis uterus mencit.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Alat-alat Reproduksi Betina**

Alat-alat reproduksi ialah organ tubuh individu yang berfungsi untuk memperbanyak diri dalam usaha mempertahankan kelestariannya (Arief, 1998). Menurut Toelihere (1981) alat-alat reproduksi betina tidak hanya menyediakan sel telur yang penting untuk membentuk individu baru, tetapi juga menyediakan lingkungan dan memberi makan untuk tumbuh selama masa-masa permulaan hidupnya. Fungsi ini dijalankan oleh alat-alat reproduksi primer dan sekunder. Alat reproduksi primer ialah ovarium sedangkan alat reproduksi sekunder terdiri dari tuba Falopii, uterus, servik, vagina dan vulva. Selain itu ada kelenjar susu yang dianggap sebagai alat kelamin tambahan, karena sangat erat kaitannya dengan proses reproduksi dan penting untuk memberi makan individu yang baru lahir.

Alat kelamin sekunder pada hewan betina merupakan saluran reproduksi yang berfungsi menerima sel telur yang dihasilkan oleh ovarium, menampung semen yang dipancarkan oleh alat kelamin jantan, sebagai tempat pertemuan spermatozoa dan ovum, serta untuk pertumbuhan embrio sampai saat dilahirkan (Partodiharjo, 1992).

Siklus birahi adalah ritme fungsi tertentu dari sistem kelamin yang terdapat pada hewan setelah masa pubertas dicapai (Ismudiono, 1999). Menurut Hardjopranjoto (1995) birahi adalah suatu keadaan dimana hewan betina bersedia

menerima pejection untuk kopulasi. Lama birahi dan waktu terjadinya ovulasi bervariasi tergantung pada spesies hewan dan faktor-faktor seperti suhu, musim, cahaya matahari, umur, penyakit, makanan, genetis, dan hormonal.

## 2.2. Uterus

Uterus ialah bagian saluran alat kelamin yang berfungsi untuk menerima ovum yang telah dibuahi atau embrio dari tuba Falopii, memberi makanan, dan melindungi fetus, selanjutnya untuk mendorong fetus kearah luar pada saat kelahiran (Hardjopranjoto, 1995). Biasanya uterus memiliki dua buah kornua dan sebuah korpus. Seluruh organ tersebut melekat pada dinding pinggul dan dinding perut dengan perantaraan ligamentum lata uteri. Melalui ligamentum inilah uterus menerima suplai darah dan syaraf (Nalbandov, 1991).

Menurut Toelihere (1981), uterus adalah saluran reproduksi betina yang berbentuk buluh berurat daging licin yang berfungsi untuk menerima sel telur yang sudah dibuahi, memberi makan, melindungi janin selama kebuntingan, dan mengeluarkan janin pada stadium permulaan saat partus. Uterus terdiri dari kornua, korpus, dan servik uteri.

Pada mencit secara anatomis terdapat dua servik dengan dua kornua terpisah (duplek) tanpa korpus uteri. Menurut Dellmann dan Brown (1992) dinding uterus terdiri dari tiga lapisan yaitu lapisan perimetrium atau membrana serosa yang membungkus seluruh organ, lapisan miometrium terdiri atas tiga lapis yaitu: lapisan otot paling dalam tersusun melingkar, lapisan otot paling luar tersusun membujur, lapisan vaskuler yang mengandung arteria besar, vena, dan pembuluh

limfe memisahkan kedua lapisan otot tersebut, lapisan endometrium terdiri dari lapisan epitelium yang membatasi lumen, lapisan glanduler dan jaringan ikat.

Menurut Nalbandov (1991), miometrium biasanya merupakan lapisan yang paling tebal diantara ketiga lapisan tersebut. Lapisan vaskulernya terisi oleh pembuluh darah untuk mensuplai uterus. Otot polos pada miometrium mampu tumbuh sangat panjang selama kebuntingan dan tanggap (responsif) terhadap hormon yang menyebabkan uterus berkontraksi misalnya pada saat melahirkan. Kelenjar uterus merupakan komponen terpenting dari endometrium. Kelenjar ini merupakan invaginasi epitelium yang berbentuk tubuler, juga dibatasi oleh sel-sel epitelium dengan bentuk kolumnar simplek.

Uterus menerima pembuluh darah dari arteri uterina media, arteri utero ovarica, dan suatu cabang dari arteri pudenda interna. Inervasi uterus terdiri dari serabut-serabut syaraf simpatik dari daerah lumbal dan torakal kaudal. Serabut-serabut syaraf simpatik berasal dari syaraf-syaraf sakral pertama sampai ketiga. Pada hewan bunting uterus akan membesar perlahan-lahan sesuai dengan pertumbuhan embrio yang disebut evolusio uteri, sedangkan pengecilan uterus setelah selesai melahirkan disebut involusio uteri (Ismudiono, 1999).

### **2.3. Zona Pelusida**

Zona pelusida ialah selubung ekstra seluler yang mengelilingi oosit mamalia yang berfungsi sebagai media pengenalan awal terhadap oosit dalam perlekatan spermatozoa ke oosit pada proses fertilisasi. Zona pelusida mengandung tiga jenis glikoprotein yang termasuk spesifik secara biokimiawi yaitu Zp1, Zp2, Zp3..

Peranan antigen zona pelusida dalam proses reproduksi ialah sebagai bahan yang potensial untuk target imunokontrasepsi (Gupta *et al.*, 1997).

#### **2. 4. Antigen dan Imunogen**

Antigen ialah suatu zat yang dapat bereaksi dengan produk-produk dari respon imun spesifik, misalnya antibodi atau limfosit T yang tersensitisasi secara spesifik. Imunogen ialah zat yang dapat membangkitkan respon imun spesifik yang terdiri dari pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler atau kedua-duanya. Zat yang imunogenik selalu antigenik tetapi antigen tidak selalu imunogenik (Bellanti, 1993).

Suatu bahan atau molekul untuk dapat bersifat imunogen tergantung kepada beberapa faktor, yaitu: komposisi kimiawi, ukuran molekul, kompleks kimiawi, susunan genetik dari hewan itu sendiri, keasingan dan metode pelaksanaannya (Goodman, 1994). Sedangkan menurut Tizard (1988), agar dapat bersifat antigenik, molekul harus berukuran besar, memiliki konfigurasi yang stabil, kimiawi kompleks, keteruraian dan asing.

#### **2.5. Antibodi**

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan sel plasma sebagai akibat dari interaksi antara limfosit B peka antigen dan antigen khusus. Antibodi memiliki kemampuan berikatan khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan penyingkirannya (Tizard, 1988). Menurut Subowo (1993) pada dasarnya antibodi itu merupakan gama globulin yang disebut sebagai

imunoglobulin (Ig), yang merupakan 20 % dari seluruh plasma protein. Secara umum imunoglobulin dikelompokkan dalam lima golongan yaitu Ig M, Ig G, Ig A, Ig E, dan Ig D.

Imunoglobulin dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini, akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis (Baratawidjaja, 1998). Menurut Bellanti (1993) antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap suatu antigen harus mempunyai ciri-ciri struktur yang berbeda, dengan antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap antigen lain.

Imunoglobulin G (Ig G) adalah Ig yang terdapat dalam konsentrasi tertinggi dalam serum dan strukturnya dapat dipakai sebagai model bagi Ig yang lain (Tizard, 1988).

## **2.6. Respon Imun**

Respon Imun ialah suatu sistem dimana tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan di luar dan di dalam badan. Respon imun diperlukan untuk tiga hal yaitu pertahanan, homeostasis, dan pengawasan (Baratawidjaja, 1998). Respon tubuh ini mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya, untuk menetralkan, menyisihkan atau memetabolisis benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri (Bellanti, 1993). Tidak semua suntikan antigen menimbulkan respon imun. Timbulnya dipengaruhi oleh dosis, waktu pemberian dan sifat antigen (Baratawidjaja, 1998).

Menurut Baratawidjaja (1998) respon imun non spesifik ialah pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai macam organisme oleh karena dapat memberi respon langsung terhadap antigen. Sistem diatas disebut non spesifik karena tidak ditujukan pada mikroorganisme tertentu. Sistem ini telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Komponen sistem imun non spesifik terdiri dari pertahanan fisik dan mekanik, pertahanan biokimia, pertahanan humoral, dan pertahanan seluler.

Respon imun spesifik merupakan suatu reaksi hospes terhadap benda asing, yaitu mencakup rangkaian interaksi seluler yang diekspresikan dengan penyebaran produk-produk sel spesifik. Respon imun spesifik dibedakan dengan respon imun non spesifik dalam hal spesifitas, heterogenitas, dan memori. Ada dua jenis mekanisme efektor yang menengahi respon imun spesifik yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler (Bellanti, 1993).

## **2.7. Kontrasepsi**

Menurut Pabadja (1992) kontrasepsi berasal dari kontra dan konsepsi. Kontra artinya mencegah atau melawan, sedangkan konsepsi adalah pertemuan antara sel telur matang dengan sperma yang mengakibatkan kehamilan. Kontrasepsi adalah menghindari atau mencegah terjadinya kehamilan. Kontrasepsi berguna untuk menunda kehamilan, menjarangkan kehamilan dan menghentikan kesuburan.

Menurut Suherman (1995), metode kontrasepsi yang dipergunakan secara umum antara lain: penggunaan obat (hormon) per oral (pil KB), suntikan atau

intravaginal; penggunaan alat dalam saluran reproduksi (kondom, alat kontrasepsi dalam rahim/AKDR); operasi (tubektomi, vasektomi); atau dengan obat topikal vagina yang bersifat spermisida.

Kontrasepsi hormonal yang sering dipakai ialah kombinasi antara progesteron dan estrogen. Kedua hormon ini berkerja dengan menurunkan hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH yang dapat menyebabkan hambatan ovulasi. Hormon-hormon ini juga mengubah jumlah dan konsistensi mukus kelenjar serviks yang dapat menghambat masuknya sperma sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya konsepsi. Hormon kelamin eksogen yang digunakan terus menerus dapat mengganggu kontraksi tuba Falopii sehingga perjalanan sel telur terhambat. Selain itu terjadi pula gangguan keseimbangan hormonal sehingga nidasi (pelepasan) telur yang dibuahi terhambat (Suherman, 1995).

Efek samping yang mungkin muncul antara lain: pusing, mual, muntah, keputihan, jerawat, depresi dan gangguan psikis (Pabadja, 1992). Efek samping lain antara lain rasa nyeri, perubahan berat badan, dan gangguan menstruasi (Sastrawinata, 1980).

Penggunaan kontrasepsi hormonal yang terus-menerus dapat menyebabkan antara lain: penurunan fungsi ovarium; perubahan histologi endometrium dan miometrium; pembesaran kelenjar payudara atau sebaliknya; gangguan siklus haid; gangguan fungsi hepar; gangguan pada metabolisme karbohidrat, lemak dan protein (Suherman, 1995)

## 2.8. Imunokontrasepsi

Imunokontrasepsi ialah kontrasepsi yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigen dan bertujuan untuk mencegah konsepsi. Bahan tersebut dapat berupa sperma, oosit atau zona pelusida pada oosit (Hamamah *et al.*, 1997).

Menurut Sastrawinata (1980), imunokontrasepsi lebih aman dibandingkan dengan kontrasepsi yang mengendalikan sistim hormonal reproduksi. Kontrasepsi hormonal yang ada sekarang ini akan mempengaruhi sistim reproduksi secara umum dan mempunyai efek samping yang dapat merugikan akseptor KB.

Imunokontrasepsi dengan menggunakan zona pelusida dari oosit matur tidak menimbulkan perubahan pada siklus birahi, hormonal dan perkembangan folikel pada ovarium (Gupta *et al.*, 1997). Menurut Castle *and* Dean (1996), agen imunokontrasepsi yang baik dapat mencegah terjadinya fertilisasi dengan tidak menimbulkan gangguan aspek kesehatan individu yang divaksin.

Imunisasi pada monyet betina dengan Zp3 babi dapat mengakibatkan infertilitas, 50% dari hewan tersebut bunting setelah titer antibodinya menurun. Hewan yang tidak bunting tidak menunjukkan perubahan yang nyata pada ovariumnya (Kaul *et al.*, 1996).

Sedangkan menurut Jones *et al.*, (1992), Imunisasi dengan Zp3 babi dapat menurunkan fertilitas dengan tidak menimbulkan perubahan histopatologis pada ovarium kelinci betina.



Monyet babon yang diimunisasi dengan zona pelusida dari monyet bonnet tidak dapat bunting walaupun berada dalam masa suburnya, dan tidak ditemukan disfungsi ovarium yang nyata (Govind *and* Gupta, 2000).

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **3.1. Waktu Dan Tempat Penelitian**

Ovarium diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Pengambilan dan pengumpulan zona pelusida dilaksanakan di Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Proses Homogenisasi dilaksanakan di *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Surabaya. Identifikasi Zp3 dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Pemberian perlakuan dilaksanakan di kandang hewan percobaan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Balai Penyelidikan Penyakit Hewan (BPPH) Wates, Yogyakarta. Penelitian dilakukan dari tanggal 01 Maret sampai 30 Oktober 2001.

#### **3.2. Bahan dan Materi Penelitian**

##### **3.2.1. Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang dipergunakan adalah 24 ekor mencit betina (*Mus Musculus*) galur Balb-G dewasa, pernah beranak, tidak dalam keadaan bunting dengan berat badan 20-30 gram. Rata-rata hewan tersebut berumur 2-3 bulan dan diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma, Surabaya.

### **3.2.2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan adalah ovarium kambing, *Complete Freund's Adjuvan(CFA)* , *Incomplete Freund's Adjuvant(IFA)*, NaCl Fisiologis. CFA berisi Parafin Oil, Arlancel A® dan *Mycobacterium smegmatis* sedangkan isi IFA sama dengan isi CFA, hanya dalam IFA tidak terdapat *Mycobacterium Smegmatis*.

### **3.2.3. Alat-alat yang Digunakan**

Alat-alat yang dipergunakan antara lain: sepuluh buah kandang mencit dari kotak plastik dengan tutup kasa di atasnya. Tempat minum dari botol, *disposable syringe* 5 ml dengan jarum 18 G, spuit tuberkulin, mikropipet, vial, Mikroskop *disecting*, serta cawan petri *disposable*.

## **3.3. Metode Penelitian**

### **3.3.1. Pengumpulan Oosit In Vitro**

Ovarium segar dicuci satu kali kemudian direndam dalam cairan NaCl fisiologis selama perjalanan dari RPH ke laboratorium. Folikel yang berdiameter 2-3 milimeter diaspirasi menggunakan *disposable syringe* 5 ml dengan jarum ukuran 18 G yang telah berisi cairan NaCl fisiologis kemudian hasil aspirasi diletakkan dalam cawan petri. Seluruh proses di atas dikerjakan secara steril.

### **3.3.2. Preparasi Zona Pelusida**

Preparasi zona pelusida dilakukan dengan cara memisahkan oosit dari zona pelusidanya dan memisahkan zona pelusida dari membrana vittelinnya di bawah

mikroskop *disecting* dengan memakai *disposable syringe* 1 ml, kemudian zona pelusida dikumpulkan sampai tercapai jumlah yang dibutuhkan untuk diproses lebih lanjut.

### 3.3.3. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida

Zona pelusida yang telah mencukupi jumlahnya ditempatkan dalam vial-vial dan dihomogenkan menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* yang mempunyai 2 buah *Probe* berukuran 2 mm selama 15 menit dengan kecepatan 25 Khz agar menjadi partikel-partikel yang lebih kecil. Selanjutnya dibagi menjadi 6 vial dengan dosis 20  $\mu\text{g}$  untuk 3 vial dan 40  $\mu\text{g}$  untuk 3 vial sisanya, satu vial dipakai untuk satu kali perlakuan.

Zona pelusida diidentifikasi dengan SDS PAGE dan kemudian kadarnya dilihat dengan spektrofotometer. Zp3 adalah fraksi zona pelusida berdasarkan berat molekul dengan peneraan menggunakan SDS-PAGE. Kadar Zp3 persatuan Zp dalam penelitian ini adalah 1,32  $\mu\text{g}$  dengan Berat Molekul 73 Kda. Untuk penyuntikan pertama suspensi Zp3 ditambah dengan CFA dan untuk penyuntikan yang kedua dan ketiga (booster I dan II) suspensi Zp3 ditambah dengan IFA dengan perbandingan 1:1. Campuran tersebut dikocok dengan menggunakan alat suntik secara berulang-ulang sampai berwarna putih. CFA digunakan untuk mempertinggi titer antibodi sedangkan IFA digunakan untuk mempertahankan titer antibodi.

### 3.3.4. Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan

Sebelum perlakuan diberikan, mencit diadaptasikan dalam kandang selama dua puluh satu hari untuk mendapatkan keseragaman dan mengamati kondisi kesehatannya.

Setelah masa adaptasi selesai mencit diberi perlakuan sebagai berikut:

1. Perlakuan kontrol (PO) diberi suntikan NaCl fisiologis 0,1 ml
2. Perlakuan I (P1) diberi suntikan suspensi 0,1 ml yang mengandung 20  $\mu\text{g}$  Zp3 dalam *CFA/IFA*.
3. Perlakuan II (P2) diberi suntikan suspensi 0,1 ml yang mengandung 40  $\mu\text{g}$  Zp3 dalam *CFA/IFA*.

Pemberian booster dilakukan pada hari ke 14 dan ke 21 setelah vaksinasi.

### 3.3.5. Pembuatan Sediaan Histologi

Pembuatan sediaan histologi meliputi : fiksasi dan pencucian, dehidrasi dan *clearing*, infiltrasi (*embedding*), pembuatan balok parafin, pengirisan dengan mikrotom secara melintang pada beberapa bagian kornua uteri sesuai dengan bentuk anatomis dari uterus mencit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan metode Harris dengan menggunakan Hemotoxylin Eosin dan penutupan gelas obyek dengan gelas penutup (*mounting*)

### 3.4. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah tebal dinding uterus mencit dan gambaran histologisnya. Pengukuran tebal dinding uterus meliputi perimetrium,

miometrium, dan endometrium. Gambaran histologis uterus yang diamati ialah gambaran mikroskopis kornua uterus yang terdiri dari gambaran sel-sel penyusunnya dan kelenjar uteri. Tebal dinding uterus diambil dari rata-rata pengukuran pada 6 daerah pada setiap lumen. Sedangkan gambaran histologisnya dilihat dari ada tidaknya perubahan pada setiap lumen.

### **3.5. Rancangan Percobaan dan Analisis Data**

#### **3.5.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga macam perlakuan dan delapan ulangan. Hewan percobaan berupa mencit betina fertil sebanyak 24 ekor dan dilakukan pengacakan dimana keadaan lingkungan dibuat sehomogen mungkin.

#### **3.5.2. Analisis Data**

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji F untuk mengetahui beda nyata diantara perlakuan untuk tebal dinding uterus. Jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan menggunakan uji BNT dengan taraf signifikansi 5% (Kusriningrum, 1989). Sedangkan data yang diperoleh dari pemeriksaan histologis dianalisis dengan uji Kruskal Wallis (Daniel, 1978). Apabila diperoleh hasil yang berbeda nyata ( $\alpha=5\%$ ) dilanjutkan uji Z (Siegel, 1986).

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

Hasil pengamatan terhadap beberapa parameter uterus setelah penyuntikan dengan zona pelusida (Zp3) kambing pada masing-masing perlakuan dengan dosis sebagai berikut: 0,1 ml NaCl Fisiologis (P0); 0,1 ml suspensi yang mengandung 20 µg Zp3 kambing dalam CFA/IFA (P1); 0,1ml suspensi yang mengandung 40 µg Zp3 kambing dalam CFA/IFA (P2) dapat dilihat pada lampiran. Hasil dari pengamatan dan perhitungan tebal dinding uterus dan perubahan gambaran histologisnya adalah sebagai berikut:

#### 4.1. Tebal Dinding Uterus Mencit

Penyuntikan Zp3 kambing dengan dosis 20 µg dan 40 µg tersebut tidak menunjukkan adanya peningkatan ketebalan dinding uterus mencit, sebagaimana dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1: Nilai rata-rata dan simpangan baku tebal dinding uterus mencit.

Perlakuan	Tebal Dinding Uterus (µm) (X ± SD)
P0	735,23 ± 135,38 <sup>a</sup>
P1	700,24 ± 47,94 <sup>a</sup>
P2	735,61 ± 119,75 <sup>a</sup>

Keterangan : Notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata.

Setelah diuji dengan Analisa Varian (Anava), dari ketiga perlakuan tersebut tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa penyuntikan Zp3 kambing dengan dosis 20  $\mu\text{g}$ ; 40  $\mu\text{g}$ ; dan NaCl fisiologis tidak memberikan perbedaan nyata terhadap tebal dinding uterus mencit.

#### **4.2. Gambaran Histologis Dinding Uterus Mencit.**

Hasil pengamatan histologis dinding uterus mencit menunjukkan adanya perubahan-perubahan sebagai berikut:

**Kontrol** : Hiperplasi kelenjar masih dalam batas normal, mitosis pada epitel, dan stroma masih tampak normal, epitel torak atau kubis yang melapisi kelenjar melebar atau kistik, tersusun secara teratur (jarang terdapat susunan berlapis).

**Perlakuan 1:** Hiperplasi kelenjar masih dalam batas normal, mitosis pada epitel, dan stroma tampak normal, epitel torak atau kubis yang melapisi kelenjar melebar atau kistik, tersusun secara teratur (jarang terdapat susunan berlapis), hiperplasi stroma, aktifitas mitosis meningkat dan ada penambahan jumlah kelenjar.

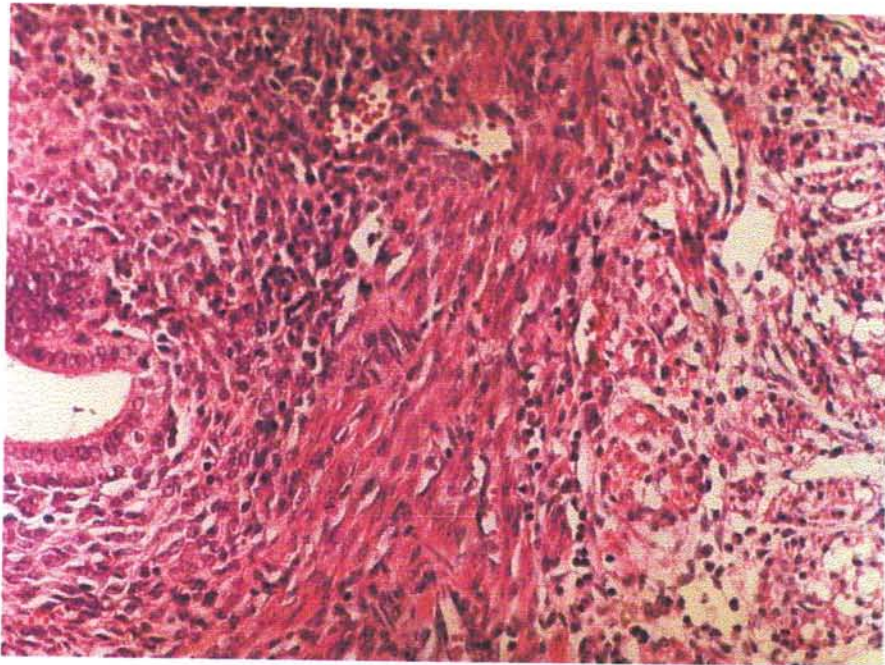
**Perlakuan 2:** Hiperplasi kelenjar masih dalam batas normal, mitosis pada epitel, dan stroma tampak normal, epitel torak atau kubis yang melapisi kelenjar melebar atau kistik, tersusun secara teratur (jarang terdapat susunan berlapis), hiperplasi stroma, aktifitas meningkat dan ada penambahan jumlah kelenjar.



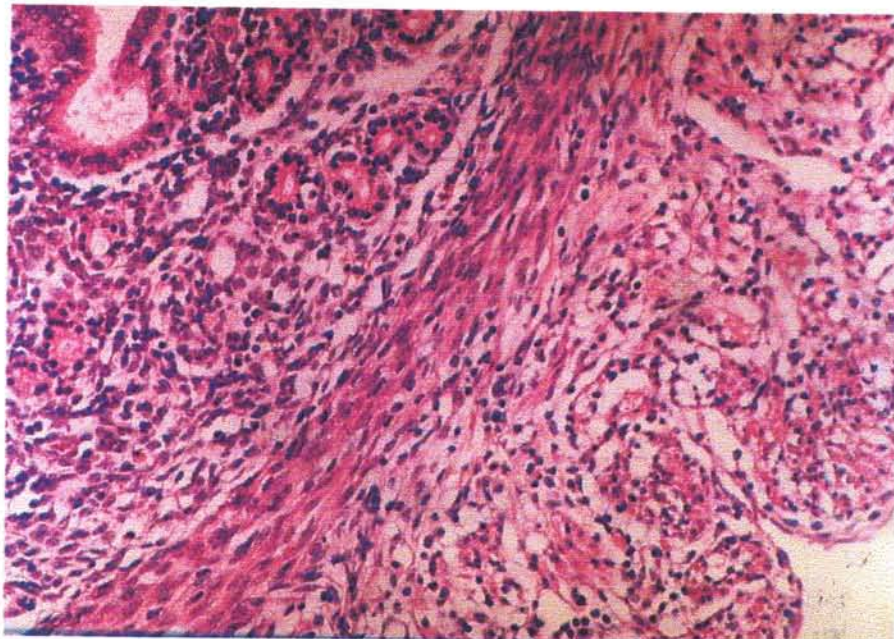
Tabel 2. Hasil skor histopatologik dinding uterus mencit dari ketiga perlakuan.

No	Dosis penyuntikan zona pelusida (Zp3) kambing					
	NaCl Fisiologis		20 $\mu$ g		40 $\mu$ g	
	Ns	R0	Ns	R1	Ns	R2
1	3	12,5	1	2	3	12,5
2	3	12,5	3	12,5	14	22,5
3	3	12,5	3	12,5	3	12,5
4	3	12,5	3	12,5	14	22,5
5	3	12,5	1	2	3	12,5
6	1	2	3	12,5	3	12,5
7	3	12,5	18	24	3	12,5
8	3	12,5	3	12,5	3	12,5
$\Sigma R$	89,5		90,5		120	
$R^2$	8010,25		8190,25		14400	
$\bar{X}$	11,1875		11,3125		15	
SD	3,7125		6,9843		4,6291	

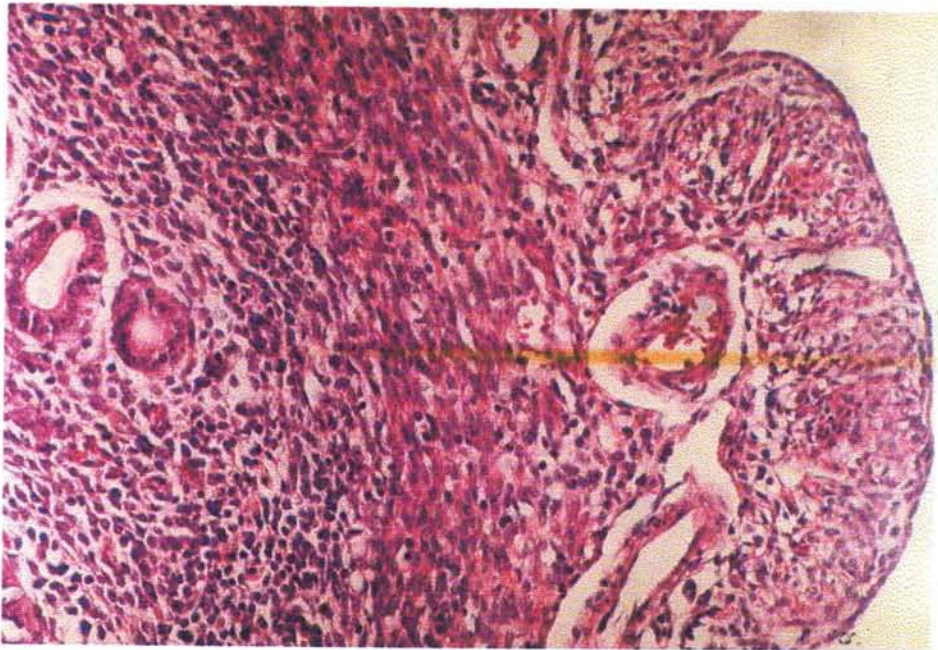
Analisa dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan yang disuntik Zp3 kambing dibandingkan dengan kontrol yang hanya disuntik NaCl Fisiologis ( $p > 0.05$ ).



Gambar 1. Gambaran mikroskopis dinding uterus mencit betina pada kontrol (NaCl Fisiologis) dengan perbesaran 200X. Semua sel masih dalam keadaan normal.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis dinding uterus mencit betina pada perlakuan I (20 µg suspensi Zp3) dengan perbesaran 200 X. Peningkatan hiperplasi seluruh kelenjar dan tebal dinding uterus masih dalam keadaan normal.



Gambar 3. Gambaran mikroskopis dinding uterus mencit betina pada perlakuan II (40  $\mu$ g suspensi Zp3) dengan perbesaran 200 X. Peningkatan hiperplasi seluruh kelenjar dan tebal dinding uterus masih dalam keadaan normal.

## BAB V

### PEMBAHASAN

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyuntikan Zp3 kambing dengan dosis 20 $\mu$ g dan 40 $\mu$ g tidak menimbulkan perbedaan ketebalan dan perubahan gambaran histologis yang nyata pada dinding uterus mencit diantara perlakuan.

#### 5.1. Tebal Dinding Uterus Mencit

Berdasarkan penelitian pada kelompok P1 (20 $\mu$ g Zp3) dan kelompok P2 (40 $\mu$ g ZP3) terdapat adanya proliferasi kelenjar yang masih dalam batas normal dan mitosis sel stroma endometrium juga masih tampak normal, sehingga tebal dinding uterus pada perlakuan ini masih tampak normal yang secara statistik terbukti tidak berbeda secara nyata dengan kontrol (NaCl fisiologis).

Menurut Robbins dan Kumar (1992), peningkatan tebal dinding uterus bisa disebabkan karena hiperplasi atau hipertropi. Pada hiperplasi, jaringan memiliki jumlah sel yang lebih banyak daripada jumlah normal, sedangkan pada hipertropi selain ada penambahan jumlah sel karena mitosis, volume tiap sel juga bertambah. Keduanya tidak dapat dibedakan secara makroskopis dan dapat terjadi secara bersamaan.

Secara fisiologis perubahan ketebalan uterus dipengaruhi oleh siklus endokrin. Hasil penelitian Setiawan (2002), penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing tidak berpengaruh pada siklus birahi dan berat badan mencit (*Mus*

*musculus*) betina sehingga siklus endokrin tidak terpengaruh. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Alim (2002), penyuntikan suspensi Zp3 kambing tidak berpengaruh terhadap perkembangan folikel pada ovarium mencit (*Mus musculus*) betina.

## **5.2. Gambaran Histologis Dinding Uterus Mencit**

Tingkat perubahan Histologis pada perlakuan 1 dan 2 dapat dikategorikan sebagai perubahan ringan dan tidak bermakna jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini ditunjukkan dengan adanya hiperplasia yang masih dalam batas normal. Hiperplasi dapat terjadi dalam keadaan fisiologis atau patologis. Hiperplasi fisiologis dibedakan menjadi jenis hormonal dan jenis kompensasi (Robbins dan Kumar, 1992).

Menurut Dellman dan Brown (1992), selama proestrus dan estrus, folikel besar dalam ovarium melepas estrogen, sedangkan selama metestrus dan diestrus, korpus luteum mengeluarkan progesteron. Estrogen dan progesteron secara luas berpengaruh terhadap perubahan daur endometrium. Endometrium berproliferasi selama proestrus sedangkan kelenjar endometrium mengalami hiperplasi serta sekresi secara maksimal pada saat diestrus. Peningkatan kadar estrogen dapat merangsang pertumbuhan serta percabangan kelenjar tetapi uliran serta sekresi kelenjar tersebut tidak akan terjadi sebelum ada rangsangan dari progesteron.

Selama fase folikuler dari siklus estrus, kelenjar uterus sederhana dan lurus dengan sedikit cabang, sedangkan selama fase luteal, saat progesteron bereaksi terhadap uterus, endometrium bertambah tebal secara mencolok, diameter dan

panjang kelenjar meningkat secara cepat, menjadi bercabang serta berkelok-kelok (Nalbandov,1991).

Secara fisiologis progesteron dan estrogen berpengaruh pada daur endometrium. Menurut Nalbandov (1991), potongan histologis melalui uterus yang terstimulasi dengan estrogen menunjukkan lebih banyak lubang yang merupakan lumen-lumen kelenjar uterus yang sederhana dan praktis tidak bercabang, selain itu estrogen juga menyebabkan peningkatan vaskularisasi dan aktivitas mitosis uterus yang lebih besar serta hiperplasi dan hipertropi otot polos miometrium. Sedangkan progesteron menyebabkan diameter uterus dan panjang kelenjarnya meningkat secara cepat dan menjadi bercabang-cabang.

Antigen Zp yang menimbulkan Ig G spesifik cukup baik untuk memblokir pertautan sperma dipermukaan Zp dengan cara merubah bentuk reseptor spermatozoa dan mengadakan pengerasan konsistensi Zp (Crightton, 1984). Pada hamster, target imunokontrasepsi yang potensial adalah Oviductal Glycoprotein (OGP) karena dapat bereaksi dengan antibodi yang ditimbulkan oleh antigen zp sehingga dapat menurunkan pertautan spermatozoa ke oosit (Schimdt *et al.*, 1997). Menurut Verhage *et al.*, (1997), OGP mempunyai peranan yang sangat penting pada proses fertilisasi. OGP pada sapi mengkapasitasi dan meningkatkan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi oosit sedangkan OGP pada hamster dan manusia meningkatkan perlekatan spermatozoa pada oosit tiga kali lipat. Sehingga OGP dapat digunakan sebagai target imunokontrasepsi.

Dari penjelasan yang telah disebutkan diatas, tidak ada peningkatan tebal dinding uterus mencit betina maupun perubahan gambaran histologisnya. Hal ini

memperkuat hasil penelitian yang dilakukan oleh Laksmi (2002), bahwa penyuntikan zona pelusida (Zp3) kambing tidak berpengaruh terhadap biometri (panjang dan berat) uterus.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Penyuntikan 0,1 ml suspensi yang mengandung 20 µg dan 40 µg zona pelusida (Zp3) kambing tidak menyebabkan penebalan dinding uterus mencit.
2. Penyuntikan 0,1 ml suspensi yang mengandung 20 µg dan 40 µg zona pelusida (Zp3) kambing tidak menyebabkan perubahan gambaran histologis dinding uterus mencit.

#### 6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, zona pelusida (Zp3) kambing merupakan bahan kontrasepsi yang potensial pada hewan dan manusia, tetapi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek samping pada organ lain dan toksisitasnya.



## RINGKASAN

**Kushendarini.** Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Secara Sub Kutan Terhadap Tebal dan Gambaran Histologis Uterus Mencit (*Mus musculus*) Betina dibawah bimbingan Budiarto M.P., Drh sebagai pembimbing pertama dan Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap tebal dan gambaran histologis mencit betina.

Model percobaan yang digunakan ialah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan Uji Analisis Varian (Anava) untuk tebal dinding uterus dan uji Kruskal Wallis untuk perubahan histologisnya. Hewan Coba yang digunakan adalah 24 ekor mencit betina strain Balb-G yang sudah pernah beranak dan dalam keadaan tidak bunting. Mencit-mencit tersebut dibagi secara acak menjadi 3 perlakuan dan 8 ulangan. Pada perlakuan I dan II, mencit disuntik dengan 0,1 ml suspensi Zp3 dalam CFA/IFA dengan dosis 20 µg dan 40 µg Zp3. Kelompok Kontrol hanya diberi 0,1 ml NaCl Fisiologis.

Vaksinasi dilakukan setelah mencit diadaptasikan selama 21 hari. Booster dilakukan pada hari ke 14 dan 21 setelah vaksinasi. Seluruh penyuntikan menggunakan *disposable Syringe* 1 ml.

Pada hari ke 24 setelah booster ke 2, mencit dibunuh untuk dibedah dan uterusnya diambil untuk dibuat sediaan histologis

Pemeriksaan mikroskopis untuk melihat ketebalan dan gambaran histologis dilakukan dengan menggunakan perbesaran  $10 \times 10$  pada setiap lumen uterus.

Rata-rata tebal uterus untuk kontrol  $735,225 \pm 135,3844$ , perlakuan I  $700,2375 \pm 217,9375$ , perlakuan II  $735,6125 \pm 119,7502$ . Sedangkan perubahan histologisnya berkisar antara 1 sampai dengan 5 dari tabel penilaian perubahan histopatologis data uterus.

Hasil pemeriksaan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara kontrol, perlakuan I, dan perlakuan II ( $p > 0,05$ ) baik untuk ketebalan maupun gambaran histologisnya. Sehingga dapat disimpulkan penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing tidak berpengaruh terhadap tebal dan gambaran histologis uterus mencit betina.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alim I. 2002. Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) kambing Terhadap Perkembangan folikel Pada Ovarium Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi.
- Anonimous. 1998. Komunikasi Informasi Edukasi Medis Kontrasepsi. Buku pedoman bagi Para Petugas Progam Keluarga berencana. 11-14.
- Arief, A. 1988. Pengantar Embriologi Hewan-Manusia. Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Malang.
- Baratawidjaja, KG. 1998. Imunologi Dasar. Edisi Ke tiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti, J.A. 1993. Imunologi III. Edisi Bahasa Indonesia. Gajah Mada Universitas Press. Yogyakarta.
- Blodinger, J. 1994. formulasi Bentuk-bentuk sediaan Veteriner. Airlangga university Press. Surabaya.
- Castle, P.E. and J. Dean. 1996. Moleculer Genetic of The Zona Pellusida :Implication for Imunocontraceptive Strategis. J Reprod. Fertil. 50: 1-8.
- Crighton, D.B. 1984. Immunological Aspect of Reproduction in Mammals. British Library. England.
- Daniel, W.W. 1978. Biostatistics:A Fondation for analisis in the Health Sciences.2<sup>nd</sup> ed. Georgia state University.
- Dellmann, H.D. dan E.M. Brown. 1992. Histologi veteriner. Edisi ketiga . Universitas Indonesia Press. 512-515.
- Epifano and J. Dean, 1994. Biology and Structure of The Zona Pellucida: A Target for Imunocontraception. 6(3): 319-30.
- Feng H., J.L. Sandlow, A.E. Sparks, and A. Sandra. 1999. Development of A Imunocontraceptive vaccine. Current status. J Reprod. Med. 44(9) : 759-65.
- Goodman, J.W. 1994. Immunogens and Antigens. In Daniel P.S., Abba, I.T., and Tristan, G.P. ed. Basic and Clinical Immunology. Appleton and Large, Norwalk, Connecticut.

- Govind C.K., and S.K. Gupta. 2000. Failure of Female Baboons (*Papio anubis*) to Conceive Following Immunization with Recombinant Non-human Primate Zona Pellucida Glycoprotein-B Expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine J.* 1; 18(26):2970-8.
- Gupta, S.K., P. Jethanandani, R. Kaul and R. Santhanam. 1997. Prospect of Zona Pellucida Glikoproteins as Immunologens for Contraseptive Vaccine. *Hum. Reprod.* 3.
- Hamamah, S. , D. Royere, M. Jean, H. Lucas, C. Barthelemy, P. Bariere, and J. Lansac. 1997. The Future of Male Contraception by Preventing Gamete Interaction. *Contracept. Fertil. Sex.* 25 (2) : 311-24.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. 23-26.
- Hasegawa, A., K. Koyama and S. Isojima, 1991. Isolatio of 4 Major Gliciprotein Families (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) of Porcine Zona Pellucida and Characterization of Antisera raised to Each Glicoprotein Family. *Nipon Sanka Fujinka Gakkai Zashi.* 43(2): 221 – 6.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jones G.R., A.G. Sacco, M.G. Subramanian, M. Kruger, S. Zhang, E.G. Yurewizs, and K.S. Mughissi. 1992. Histology of Ovaries of Female Rabbit Immunized with Deglycosylated Zona Pellucida Macromolekul of Pigs. *J Reprod. fertil.* 95(2) : 513-25.
- Kaul R., A. Alzalpurkar, and S.K. 1996. Strategy for Designing An Immunocontraceptive Vaccine Based on Zona Pellucida Syntetic Peptides and Recombinant Antigen. *J Reprod. Fertile. Suppl.* 50 : 127-34
- Kusriningrum, R. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Laksmi, DMK. 2002. Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Biometri Uterus dan Ovarium Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi.
- Martinez MI, and J.D. Harris. 2000. Effectiveness of Zona Pellucida Protein ZpB as An Imunocontraceptive Antigen
- Miller, A B. 1978. An Overview of Human Associated Cancers. *Cancer Res.* 38: 3985. Dalam Robbin, S.L. dan V. Kumar. 1992.

- Nalbandov, A.V.1991. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Edisi 3. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 33-35, 147-149.
- Pabbadja, S. 1992. Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera Untuk Kader Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 21-33.
- Partodiharjo, s. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Prasetya, B. 1997. Pengaruh Pemberian Estrogen Jangka Lama Terhadap Tebal dan gambaran Histopatologik Dinding Uterus Mencit (*Mus musculus*). Skripsi.
- Rankin, T., M. Familari, E. Lee, A. Ginsberg, N. Dwyer, J. Blanchette-Mackie, J. Drago, H. Westphal and J. Dean. 1996. Mice Homozygous for An Insertional Mutation in The Zp3 Gene Lack A Zona Pellucida and Are Infertile. *Devlp* 122, 2903-2910.
- Rankin, T., M. O'Brien, E. Lee, K. Wigglesworth, J. Eppig, and J. Dean. 2001. Defective Zonae Pellucidae in Zp2-null Mice Disrupt Folliculogenesis, Fertility and Development. *Devlp* 128, 1119-1126.
- Robbins, S. L. dan V. Kumar. 1992. Buku Ajar Patologi I. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 203-300.
- Robbins, S. L. dan V. Kumar. 1992. Buku Ajar Patologi II. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 372-387.
- Sastrawinata, S.R. 1980. Tehnik keluarga Berencana. Elstar Offset. Bandung.
- Schimdt A., P.A. Mavrogianis, M.B. O'Day Bowman, R.C. Jaffe, and H.G. Verhage. 1997. Characterization of Antibodies Generated Against A Conserved Portion of Oviductal Glycoprotein (OGP) and Endogenous Hamster OGP and Their Ability to Decrease Sperm Binding To The Zona Pellucida in Vitro. *Am J. Reprod. Immunol.*;38(6):377-83.
- Setiawan B. 2002. Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Oosit Kambing terhadap Perubahan Siklus Birahi dan Berat Badan Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi.
- Shimizu, S., M. Ito, and J. Dean. 1982. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 109: 449-454.
- Siegel, S. 1986. Statistik Non parametrik untuk Ilmu Sosial. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Subowo. 1993. Imunologi. Penerbit Angkasa. Jakarta.

- Suherman S.K. 1995. Estrogen, Antiestrogen, Progestin dan Kontrasepsi Hormonal dalam Farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 329-344.
- Talevi, R., R. Gualtieri, G. Tartaglioni, and A. Fortunato. 1997. Heterogeneity of Zona Pellucida in Human Oocytes Failing to fertilize in Vitro. Human Reprod. 12(12). 27773-80.
- Tizard. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya. 39.
- Toelihere. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.
- Verhage H.G., A.T. Fazleabas, P.A. Mavrogianins, M.B. O'Day-Bowman, A. Schimdt, E.B. Arias, and R.C. Jaffe. 1997. Characteristic of An Oviductal Glycoprotein and Its Potential Role in Fertility Control. J. Reprod. Fertil Suppl.;51:217-26
- Wood, D.M., C. Luu, and D.W. Richardson. 1982. Gamete Research. 5: 271-281.
- Yuniarti, D. 2002. Pengaruh Penyuntikan Zona Pelusida (Zp3) kambing Terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Janin Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi.

## Lampiran 1. Evaluasi Statistik tebal dinding uterus Mencit.

No. Mencit	Tebal dinding uterus mencit		
	P0	P1	P2
1	497,7	735,5	767,9
2	717,2	647,5	587,3
3	843,5	630,7	961,8
4	865,2	686	809,2
5	792,4	717,5	606,9
6	590,1	707	678,3
7	707	781,9	715,4
8	868,7	685,8	758,1
$\bar{X}$	735,225	700,2375	735,6125
$\Sigma X$	5881,8	5601,9	5884,9

**UJI ANAVA**

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{Y..^2}{t.n} = \frac{(17368,6)^2}{3 \times 8} = 12569511,08$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= \sum_{i=j}^t \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - \text{FK} \\ &= 497,7^2 + 717,2^2 + \dots + 715,4 + 758,1 - \text{FK} \\ &= 12820891,22 - 12569511,08 \\ &= 251380,14 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \sum_{i=j}^t \frac{Y_i.^2}{n} - \text{FK} \\ &= \frac{5881,8^2 + 5601,9^2 + 5884,9^2}{8} - \text{FK} \\ &= 12576112,86 - 1256911,08 \end{aligned}$$

$$= 6601,78$$

$$\text{JK Sisa} = \text{JK total} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 251380,14 - 6601,78 = 244778,36$$

$$\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{t-1} = \frac{6601,78}{3-1} = 3300,89$$

$$\text{KT Sisa} = \frac{\text{JKS}}{t(n-1)} = \frac{244778,36}{3(8-1)} = 11656,11238$$

$$\text{F Hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTS}} = \frac{3300,89}{11656,11238} = 0,283189616$$

S.K	db	J.K	K.T	F Hitung	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	2	6601,78	3300,89	0,2832	3,47	5,78
Sisa	21	244778,36	11656,1124			
Total	23	251380,14				

$$F \text{ Hitung } (0,2832) < F \text{ Tabel } 0,05 (3,47) < F \text{ Tabel } 0,01 (5,78)$$

**Kesimpulan** : Penyuntikan Zona pelusida tidak memberikan perbedaan yang nyata diantara perlakuan dan kontrol.

Ho : Diterima

Hi : Ditolak



Lampiran 2: Tingkat perubahan dan skor histopatologik dinding uterus mencit yang disuntik dengan 0,1 mlNaCl fisiologis.

No	Tingkatan histopatologik																	ΣX
	A			B					C					D				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ΣX																		22

Keterangan: + Terdapat perubahan

- Tidak terdapat perubahan

Lampiran 3. Tingkat perubahan dan skor histopatologik dinding uterus mencit yang disuntik dengan 0,1 ml suspensi yang mengandung 20 µg ZP3 kambing dalam CFA/IFA.

No	Tingkatan histopatologik																	ΣX
	A			B					C					D				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
7	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ΣX																		34

Keterangan : + Terdapat perubahan

- Tidak terdapat perubahan

Lampiran 4. Tingkat perubahan skor histopatologik dinding uterus mencit yang disuntik dengan 0,1 ml suspensi yang mengandung 40 µg ZP3 kambing dalam CFA/IFA.

No	Tingkatan histopatologik																	ΣX
	A			B					C					D				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ΣX																		46

Keterangan : + Terdapat perubahan

- Tidak terdapat perubahan

Lampiran 5. Penilaian (skor) perubahan histologik dinding uterus (Norris, 1983) dikutip oleh Prasetya (1997).

TINGKAT	NILAI	TINGKAT PERUBAHAN HISTOPATOLOGIK
(A) Hiperplasi Ringan	1	Hiperplasi kelenjar masih dalam batas normal dan mitosis pada epitel dan stroma tampak normal.
	2	Epitel torak atau kubis yang melapisi kelenjar melebar atau kistik, tersusun secara teratur (jarang terdapat susunan berlapis).
	3	Hiperplasi stroma.
(B) Hiperplasi Sedang	4	Aktivitas mitosis meningkat.
	5	Ada penambahan jumlah kelenjar.
	6	Variasi bentuk dan ukuran kelenjar yang nyata.
	7	Epitel yang melapisi berbentuk kubis dan sering berlapis-lapis.
	8	Pertumbuhan papil kedalam lumen kelenjar.
	9	Gambaran umum menunjukkan terlalu banyak kelenjar dan terlalu sedikit stroma.
(C) Hiperplasi Atipik	10	Sel epitel memiliki inti yang nyata dalam beberapa ukuran dan berbentuk yang berbeda-beda serta menunjukkan banyak mitosis.
	11	Terdapat penumpukan kelenjar dengan berbagai macam ukuran sehingga saling berdesakan, kadang-kadang terdapat kelenjar dalam kelenjar.
	12	Epitel tidak lagi tersusun secara teratur, kadang-kadang berlapis atau membentuk jembatan yang menyekat lumen.
	13	Pada keadaan parah, adakalanya kelenjar dilapisi oleh sel epitel besar, kemerahan dan anaplastik.
(D) Neoplasia	14	Kelenjar membentuk kistik.
	15	Bentuk kelenjar yang melapisi oleh epitel kubis sampai torak yang mengalami anaplasia.
	16	Adanya polip yang dilapisi oleh epitel torak.
	17	Adanya edema stroma.

Lampiran 6: Penentuan peringkat (rank) dan analisis data histopatologik dinding uterus menciit.

### UJI KRUSKAL WALLIS

Angka-angka yang menunjukkan nilai skor histopatologik yang sama baik dalam satu kelompok akan memberikan nilai yang sama. Cara mencari peringkat adalah dengan menjumlah nilai skor histopatologik terkecil dibagi dengan banyaknya nilai derajat perubahan histopatologik tersebut.

$\text{Nilai skor histopatologik 1 mempunyai rank} = \frac{1+2+3}{3} = 2$
$\text{Nilai skor histopatologik 3 mempunyai rank} = \frac{4+5+6+\dots+19+20+21}{18} = 12,5$
$\text{Nilai skor histopatologik 14 mempunyai rank} = \frac{22+23}{2} = 22,5$
$\text{Nilai skor Histopatologik 18 mempunyai rank} = \frac{24}{1} = 24$

Selanjutnya, dari hasil diatas dapat diketahui harga hitung H dengan

rumus:

$$H \text{ hitung} = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Keterangan : N = Jumlah sampel keseluruhan

n = Jumlah ulangan

R = Jumlah nilai peringkat dalam kelompok

Maka:

$$\begin{aligned}
 H \text{ hitung} &= \frac{12}{24(24-1)} \left\{ \frac{(89,5)^2 + (90,4)^2 + (120)^2}{8} \right\} - 3(24+1) \\
 &= 0,02 \left\{ \frac{8010,25 + 8190,25 + 14400}{8} \right\} - 75 \\
 &= 76,50125 - 75 \\
 &= 1,50125
 \end{aligned}$$

Karena dalam data terdapat angka kembar, maka harus dilakukan koreksi terhadap hasil H hitung agar didapat hasil yang lebih benar. Rumus yang digunakan adalah:

$$H \text{ hitung terkoreksi} = \frac{H \text{ hitung}}{1 - \frac{T}{N^3 - N}}$$

Dari rumus diatas harga H hitung dan nilai N sudah diketahui, jadi tinggal mencari nilai T. Nilai T diperoleh dengan rumus:

$$T_i = t^3 - t \qquad t = \text{banyaknya angka kembar}$$

Maka diperoleh :

$$T_1 = 3^3 - 3 = 24$$

$$T_3 = 18^3 - 18 = 5814$$

$$T_{14} = 2^3 - 2 = 6$$

$$T_{18} = 1^3 - 1 = 0$$

$$T = \sum T_i = 5844$$

$$H \text{ hitung terkoreksi} = \frac{1,50125}{5814} = 2,59422$$
$$1 - \frac{1}{24^3 - 24}$$

Dengan diketahui harga hitung terkoreksi = 2,59422 dan derajat bebas = 2, maka dapat ditentukan tabel  $X^2$  sebagai berikut:

$$\text{Tabel } X^2 \text{ } 0,05 \text{ (2)} = 5,991$$

$$\text{Tabel } X^2 \text{ } 0,01 \text{ (2)} = 9,210$$

Tampak bahwa  $H \text{ hitung} < \text{Tabel } X^2 \text{ (0,05)} < \text{Tabel } X^2 \text{ (0,01)}$ , maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok-kelompok perlakuan.

## Lampiran 7. Pembuatan Sediaan Histologis Uterus Mencit.

Pembuatan sediaan histologis dilakukan dengan cara sebagai berikut:

### a. Fiksasi dan pencucian

Tujuan : Mencegah terjadinya degenerasi post mortem, mematikan kuman dan bakteri, meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna, menjadikan jaringan lebih keras sehingga menjadi mudah dipotong dan meningkatkan indeks refraksi berbagai komponen jaringan.

Reagen : Formalin 10%

Cara kerja : Setelah diadakan seksi, uterus mencit diambil, selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% sekurang-kurangnya 24 jam dan kemudian dilakukan pencucian dengan air kran yang mengalir selama setengah jam.

### b. Dehidrasi dan *Clearing*

Tujuan : Untuk menarik air dari jaringan dan membersihkan dan menjernihkan jaringan

Reagen : Alkohol 70%, 80%, 96%, Alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II.

Cara kerja : Uterus yang telah dicuci dengan air kran selama setengah jam dimasukkan ke dalam reagen dengan urutan alkohol 70 %, 80%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II masing-masing setengah jam.

### c. Infiltrasi (*Embedding*)

Tujuan : Untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin, dimana parafin akan menembus ruangan antar sel dan didalam sel sehingga lebih tahan terhadap pemotongan.



Reagen : Parafin I dan parafin II.

Cara kerja : Jaringan dimasukkan kedalam parafin I yang mencair, kemudian dimasukkan kedalam oven selama setengah jam, selanjutnya dimasukkan kedalam parafin II dan oven selama setengah jam pada suhu 60°C.

d. Pembuatan Balok Parafin.

Tujuan : Supaya jaringan mudah dipotong.

Reagen : Parafin cair.

Cara kerja : Sediakan beberapa cetakan besi yang sebelumnya diolesi gliserin dengan maksud untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan, kemudian uterus dimasukkan dengan pinset ke dalamnya, diberi tanda pada masing-masing organ dan ditunggu sampai parafin membeku.

e. Pengirisan dengan Mikrotom

Tujuan : Untuk memotong jaringan setipis mungkin agar mudah dilihat di bawah mikroskop.

Alat : Mikrotom

Cara kerja : Uterus yang telah di-*blocking*, diletakkan pada *holder*, kemudian dipotong dengan mikrotom setebal 5-7 m, diambil dan dicelupkan dalam air hangat dengan suhu 20°C sampai 30°C agar jaringan mengembang dengan baik, selanjutnya diletakkan pada gelas objek yang sebelumnya telah diolesi *egg albumin*, kemudian dikeringkan diatas *hot plate*.

f. Pewarnaan.

Tujuan : Memudahkan melihat perubahan jaringan. Disini digunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Dengan pewarnaan HE dapat dilihat

dengan jelas bentuk-bentuk masing-masing selnya. Dimana sitoplasma berwarna merah dan intinya berwarna biru.

Cara kerja : Pewarnaan HE dilakukan dengan metode Harris, dengan cara sebagai berikut jaringan yang telah kering dimasukkan kedalam xylol I selama tiga menit dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xylol II, kemudian alkohol absolut I dan II, alkohol 96%, 80%, 70% dan air kran masing-masing satu menit. Kemudian jaringan atau organ dimasukkan kedalam zat warna hematoxylin selama 5-10 menit, air kran 2-5 menit, asam alkohol 3-10 celupan, air kran 4-7 celupan, amoniak 6 celupan, air keran 10 menit, aquades secukupnya. Kemudian masukkan dalam alkohol 70%, alkohol 80% masing-masing selama setengah menit, alkohol 96%, alkohol absolut I dan II selama 1-2 menit dan selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa pewarnaan.

*g. Mounting*

Penutupan gelas objek dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi *canada balsem*.

Lampiran 8: Proses SDS-PAGE (*Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels Electrophoresis*)

Komposisi gel SDS-PAGE

No	Bahan	Separating Gel 12%	Stacking Gel 3%
1	1,5 Tris-HCl (pH 8,7) (ml)	1,75	1
2	2,9% Acrylamide + 0,8 % Bisacrylamide (ml)	2,8	0,4
3	10% SDS (ml)	0,07	0,04
4	Air (ml)	2,38	2,3
5	Temed ( $\mu$ l)	9	4
6	10% Ammonium Per Sulphate (APS) ( $\mu$ l)	90	40

*Separating gel* dibuat dengan mencampur semua bahan kecuali APS dan TEMED, kemudian dididihkan selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, kocok sebentar kemudian dimasukkan ke dalam plate dan dibiarkan selama 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa dididihkan, dan setelah *Separating gel* mengeras. Larutan *Stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada alat *Electrophoresis set mini protein gel*, dan *Running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Antigen zona pelusida dicampur dengan *Reducing Sample Buffer* dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tiap sumuran masing-masing 20  $\mu$ l. *Running* dilakukan dengan arus konstan 40 mA sampai sampel berada 0,5 cm di atas dasar gel. Gel hasil *running* diwarnai dengan *Comassie Brilliant Blue*.