

**SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR  $\beta$*  ( *TGF  $\beta$* ) SEBAGAI BAHAN YANG BERPERAN PADA PROSES MATURASI DAN DIFFERENSIASI OOSIT SAPI**




Oleh :

MEIRIO ALFATONA GRANDIVA  
DKI - JAKARTA

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

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**.

Menyetujui,  
Panitia Penguji



Epy M. Luqman, M.Si., Drh.  
Ketua



Dr. Wurlina, M.S., Drh.  
Sekretaris



Herry Agoes Hermadi, M.Si., Drh.  
Anggota



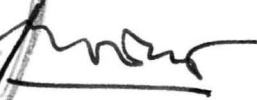
Husni Anwar, Drh.  
Anggota



Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh.  
Anggota

Surabaya, 23 Agustus 2005  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



  
Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.  
NIP. 130687297

# IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR* $\beta$ ( *TGF* $\beta$ ) SEBAGAI BAHAN YANG BERPERAN PADA PROSES MATURASI DAN DIFFERENSIASI OOSIT SAPI

Meirio Alfatona Grandiva

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( *TGF*  $\beta$  ) dari oosit dengan kumulus kompleks dan granulosa immatur yang dinyatakan dalam berat molekul dan diharapkan sebagai protein yang imunogenik yang digunakan sebagai antibodi monoklonal untuk kepentingan dalam bidang transfer embrio.

Ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Krian dilakukan aspirasi pada folikel – folikel ovariumnya, kemudian diekstraksi dengan teknik sonikasi. Identifikasi fraksi protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( *TGF*  $\beta$  ) dilakukan dengan proses *Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* ( SDS-PAGE ).

Hasil penelitian didapatkan beberapa fraksi protein. Pada sumur *loading* pertama terdapat 3 fraksi protein yaitu : 126,38 KDa; 116 KDa; 103,5KDa. Sedangkan pada sumur *loading* ke 2 terdapat 3 fraksi protein yaitu : 124,3 KDa; dan 95,2 KDa dan 24,53 KDa. Fraksi protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( *TGF*  $\beta$  ) yang tampak pada pita protein dengan berat molekul sebesar 24,53 KDa.

Perlunya penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan protein spesifik *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( *TGF*  $\beta$  ) melalui pemurnian protein dan penggunaan antibodi spesifik anti *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( *TGF*  $\beta$  ) yang dapat dipergunakan untuk uji imunoblotting dan ELISA.

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian dengan judul **“Identifikasi dan Karakterisasi *Transforming Growth Factor  $\beta$  ( TGF  $\beta$  )* sebagai Bahan yang Berperan pada Proses Pematangan dan Diferensiasi Oosit Sapi”** ini dengan baik.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Bapak Husni Anwar, Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh selaku dosen pembimbing kedua dan ketua tim Peneliti Proyek Hibah Pekerti, Ibu Widjiati M.Si., Drh selaku anggota tim peneliti Proyek Hibah Pekerti, Bapak Masduki, karyawan Lab Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Unair yang telah membantu penulis dalam mempersiapkan alat – alat serta bahan sehingga penelitian dan penulisan ini dapat diselesaikan dengan lancar.

Rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada Bapak Epy Muhamad Luqman, M.Si., Drh selaku ketua penguji makalah seminar dan skripsi. Ibu Dr.Wurlina, M.S., Drh sebagai sekretaris dan Bapak Herry Agoes Hermadi, M.Si., Drh sebagai anggota tim penguji pada makalah seminar dan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada keluarga yang telah memberikan dorongan dan dukungan serta do'a restu hingga penelitian dan penulisan makalah ini dapat diselesaikan dengan baik serta *My beloved* Malva

yang selalu memberikan senyum dan cerianya sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan penelitian ini dari awal hingga akhir.

Penulis menyadari bahwa penulisan makalah ini jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik demi perbaikan tulisan ini. Semoga yang telah penulis kerjakan dan tulis mendapat berkah dari Allah dan dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan khususnya di bidang Ilmu kedokteran hewan dan masyarakat luas. Amin.

Surabaya, Agustus 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR.....	iii
DAFTAR GRAFIK.....	iv
DAFTAR LAMPIRAN.....	v
BAB I       PENDAHULUAN	
1.1    Latar belakang masalah.....	1
1.2    Perumusan Masalah.....	2
1.3    Landasan Teori.....	3
1.4    Tujuan Penelitian.....	5
1.5    Manfaat Penelitian.....	5
BAB II       TINJAUAN PUSTAKA	
2.1    Folikulogenesis dan Ovulasi.....	6
2.2    Transforming Growth Factor $\beta$ .....	7
BAB III      MATERI DAN METODE	
3.1    Waktu dan Tempat Penelitian.....	9
3.2    Bahan dan Alat.....	9
3.3    Media Penelitian.....	10
3.4    Metode Penelitian.....	10
3.5    Prosedur Penelitian.....	11

BAB IV	HASIL PENELITIAN.....	15
BAB V	PEMBAHASAN.....	16
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	18
	RINGKASAN.....	19
	DAFTAR PUSTAKA.....	21
	LAMPIRAN.....	24

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil Fraksinasi Protein <i>Transforming Growth Factor</i> $\beta$ ( TGF $\beta$ ) dengan teknik SDS – PAGE.....	14



## DAFTAR GRAFIK

Grafik	Halaman
1. Kurva hubungan RF dengan log. BM Protein Standar.....	24

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Kuarva Hubungan RF dengan log. BM Protein Standard.....	25
2. Cara Kerja SDS – PAGE 12 %.....	27
3. Bahan / Media Maturasi Sel Oosit.....	31

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Lebih dari dua dekade, sistem kultur sel embrio telah berkembang dengan tujuan akhirnya yaitu pertumbuhan oosit dari tahap awal folikel hingga ke tahap maturasi dan fertilisasi. Bagaimanapun juga kemajuan yang ada sangat lambat sekali dalam mengembangkan teknik yang ada untuk sistem kultur sel bagi spesies dengan periode pertumbuhan folikulernya lambat, contohnya pada manusia dan hewan domestik. Banyak alasan teknis untuk kurangnya kemajuan terhadap cara yang ditemukan bagi spesies – spesies tersebut, tetapi masalah yang paling utama adalah kita mempunyai pengetahuan yang sangat sedikit tentang bagaimana oosit memenuhi kemampuan berkembangnya selama pertumbuhannya dalam folikel. Pada masa sekarang, keuntungan yang paling utama pada kultur sel yang juga mampu untuk mendukung tumbuh kembangnya oosit yang belum dewasa adalah memajukan pengetahuan terhadap koordinasi dari perkembangan oosit dan diferensiasi sel granulosa, dan memahami aturan perkembangan dari faktor autokrin / parakrin yang mengontrol proses tersebut (Thomas, *et al* 2003).

Sejalan dengan kurangnya kemajuan dalam teknik sistim kultur sel secara invitro maka begitu juga kemajuan penelitian di bidang transfer embrio masih belum bisa memenuhi embrio secara kuantitas dan kualitas. Hal ini berdasarkan pada hasil angka kebuntingan apabila embrio yang diproduksi secara *in vitro* ditransfer ke resipien menghasilkan angka kebuntingan yang rendah.

Masih rendahnya angka kebuntingan ini perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat pada proses maturasi oosit banyak protein diduga berperan dalam proses pematangan oosit, dan sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui. ( Pawshe, et al 1996 ).

Pentingnya mengetahui peran protein yang mempunyai fungsi menjaga kualitas oosit untuk dipakai dalam produksi embrio *in vitro* dan pencarian metode alternatif untuk deteksi kualitas oosit berdasarkan profil protein selama proses maturasi. Telah diketahui bahwa *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( *TGF  $\beta$*  ) mempengaruhi berbagai sel ovari termasuk sintesis DNA pada membran sel granulosa dan proses steroidogenesis. Kerja biologis *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( *TGF  $\beta$*  ) diperantarai oleh reseptor permukaan sel tipe I dan II ( *TBR I* dan *TBR II* ) ( Godkin and Dore, 1998 ; Osterlund and Fried, 2000 ).

## 1.2 Perumusan Masalah

Fakta di lapangan menunjukkan bahwa kualitas produksi embrio sapi secara *in vitro* baik di tingkat nasional maupun internasional masih cukup rendah. Hal ini terlihat dari angka kebuntingan apabila embrio yang dihasilkan secara *in vitro* ditransfer ke resipien. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa produksi embrio *in vitro* tahap blastosis pada sapi sekitar 30% - 40% (Blerkon *et al*, 1990) dan domba sekitar 36% sedangkan pada kambing hanya 11% ( Boediono *dkk.*, 1999 ).

Salah satu faktor yang memberikan kontribusi terhadap rendahnya produksi embrio adalah adanya tahap maturasi yang sangat heterogen sehingga

proses pematangan akhir tidak berjalan secara sempurna ( Hytell *et al.*, 1997 ). Dari penelitian yang telah dilakukan Widjiati dan Rimayanti, ( 2001 ) diketahui bahwa oosit yang dipanen dari folikel ukuran 3 – 12 mm persentase jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II adalah 50%, sedangkan oosit yang dipanen dari folikel ukuran kurang dari 3 mm hanya mencapai 12%. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas yang dihasilkan secara *in vitro* dari folikel yang berdiameter besar lebih baik dari pada oosit yang dipanen dari folikel berdiameter kecil. Demikian juga tingkat fertilisasi oosit yang dikoleksi dari beberapa ukuran folikel berpengaruh terhadap angka fertilisasi. Folikel ukuran 1 – 2mm; 3 – 5mm dan 6–8 mm menghasilkan angka fertilitas yang bervariasi, secara berurutan adalah 53%, 90%, dan 91,6% ( Widjiati dan Rimayanti, 2002 ).

### 1.3 Landasan Teori

Rendahnya produksi embrio secara *in vitro* pada tahap blastosis, salah satunya adalah sistem kultur dan seleksi ukuran folikel yang belum diperhatikan. Ukuran folikel mempengaruhi ukuran sel kumulus kompleks. Secara molekuler pada setiap variasi ukuran folikel terjadi sintesis protein yang berbeda, yang diduga sangat menentukan oosit setelah maturasi, secara berurutan menentukan kualitas embrio yang akan diproduksi secara *in vitro*. Hal ini diduga bahwa ukuran oosit yang heterogen menyebabkan proses pematangan akhir ( kapasitas ) tidak berjalan secara sempurna sehingga proses sistesis beberapa protein diduga berkaitan dengan proses maturasi yang disintesis oleh mRNA (Hytell *et al.*, 1997). Oosit yang diperoleh dari folikel yang heterogen menyebabkan

pertumbuhan oosit secara *in vitro* tidak dapat mencapai perkembangan kapasitas yang seragam dari kondisi ini sangat mempengaruhi proses perkembangan selanjutnya. Oleh karena itu perlu dilakukan penyeragaman pada saat melakukan kultur *in vitro* ( Pawshe *et al.*, 1996 ).

Beberapa hasil penelitian diketahui ukuran sel kumulus kompleks berperan terhadap proses pematangan sel telur. Oosit dengan sel kumulus kompleks transisional dan intermedier apabila dilakukan maturasi memberikan hasil yang berbeda terhadap kualitas oosit yang dihasilkan. Selain itu *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarii termasuk sintesis DNA sel granulosa dan proses steroidogenesis. *Transforming Growth Factor  $\beta$*  menghambat proliferasi sel dan menginduksi diferensiasi sel. Kerja biologis *Transforming Growth Factor  $\beta$*  diperantarai oleh reseptor permukaan sel tipe I dan II ( TBR I dan TBR II ). Dari banyak penelitian disebutkan bahwa *Transforming Growth Factor  $\beta$*  sangat mempengaruhi fungsi sel granulosa sehingga apabila terjadi ekspresi prematur atau over ekspresi dari reseptor *Transforming Growth Factor  $\beta$*  dalam membran sel granulosa akan menyebabkan perubahan mekanisme kerja *Transforming Growth Factor  $\beta$*  pada sel granulosa. ( Godkin and Dore, 1998; Osterland and Fried, 2000 ). Perubahan mekanisme kerja dari *Transforming Growth Factor  $\beta$*  pada sel – sel granulosa akan mengubah lingkungan mikro intrafolikular, yang akan berpengaruh buruk pada kemampuan oosit untuk berkembang menjadi embrio praimplantasi yang normal secara morfologis ( Yang and Roy, 2001; Leese, 1995 ).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) dari granulosa immatur dan oosit dengan kumulus kompleks ( okk matur )

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh setelah dilakukan penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi ilmiah tentang adanya fraksi protein *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) yang berperan pada proses maturasi oosit.
2. Dapat diidentifikasi berdasarkan berat molekul fraksi protein spesifik *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) dari granulosa immatur dan oosit dengan kumulus kompleks ( okk matur ).

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang Folikulogenesis dan Ovulasi

Folikulogenesis adalah rangkaian urutan kejadian dari tahap – tahap pendewasaan dan diferensiasi baik pada sel somatik maupun *germ cells* dan mencapai puncaknya pada produksi dari oosit dan mampu melakukan fertilisasi dan memenuhi kebutuhan selama fase perkembangan embrional ( Glister *et al.*, 2003 ). Cadangan folikel primordial dibentuk selama masa kehidupan fetus atau segera setelah lahir, beberapa folikel primordial tumbuh secara konstan selama kehidupan sampai cadangan habis. Perkembangan folikel diawali dengan pertumbuhan dan bertambah banyaknya jumlah sel pipih yang mengelilingi oosit. Bila ovum telah terbentuk sempurna, sel mulai terpisah dan terbentuk rongga diantaranya. Rongga ini berisi cairan dan perlahan – lahan menjadi rongga besar yang disebut *antrum*. Sel yang mengelilingi *antrum* tersebut disebut sel – sel granulosa. Ovum terletak pada salah satu sisi folikel dalam benjolan sel – sel granulosa yang disebut *Cumulus Oophorus* atau *Discus Proligerus*. Menjelang waktu ovulasi, banyak sel *Cumulus Oophorus* terlepas ovum dengan *Corona Radiata* serta beberapa sel *Cumulus Oophorus* dibebaskan dari sel granulosa yang masih tertinggal.

Selama folikel mengalami perkembangan, ovum tetap berada pada tingkat awal pembelahan heterotipe. Menjelang ovulasi, bila sel cumulus telah terlepas, mulailah tingkat akhir pendewasaan ovum ( Ismudiono, 1999 ).

Penelitian terbaru pada rodensia yang mencakup kultur sel granulosa oosit dan / atau perbandingan dari *Cumulus Oosit Complexes* ( COCs ) utuh

menunjukkan bahwa oosit mengsekresikan faktor yang mampu mempengaruhi diferensiasi dan proliferasi pada sel granulosa. Pengamatan terhadap faktor – faktor oosit yang dapat menekan FSH – menginduksi produksi steroid juga telah dikembangkan pada babi dan hewan ternak lainnya termasuk juga pada sapi. Faktor – faktor yang diketahui diekspresikan oleh oosit dan berpengaruh terhadap kejadian atau tahap – tahap folikulogenesis pada fungsi sel granulosa termasuk pada beberapa anggota dari *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( *TGF  $\beta$*  ) superfamily ( GDF – 9, BMP – 15/GDF - 9B, BMP – 6, *Epidermal Growth Factor* ( *EGF* ), dan *Transforming Growth Factor* ( *TGF* ) ) ( Glistler *et al.*, 2003 ).

## 2.2 Tinjauan tentang *Transforming Growth Factor $\beta$*

*Transforming Growth Factor* ( *TGF  $\beta$*  ) termasuk famili polipeptida berantai – rantai disulfida dengan berat molekul 25 KDa yang dibentuk dari sejumlah protein yang secara potensial berperan dalam regulator intraovari dari fungsi ovarium ( Masague, 1994; yang and Roy, 2001 ). *TGF  $\beta$*  merupakan faktor diferensiasi dan pertumbuhan sama seperti halnya dengan faktor tumbuh kembang *Factor – 9* ( *GDF – 9* ), Mullerian Inhibitory Substance ( *MIS* ), *Activin* dan *Inhibin* ( Thomas, 2003 ). Telah ditunjukkan pada penelitian sebelumnya bahwa fungsi dari *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( *TGF  $\beta$*  ) didapatkan dari cairan folikuler selama masa stimulasi ovarium pada fertilisasi *In Vitro* ( *IVF* ), dan konsentrasinya meningkat pada betina yang sedang bunting setelah dilakukan embrio transfer ( Fried and Wramsby, 1998 ). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa *TGF $\beta$*  kemungkinan mempunyai efek yang penting pada masa preimplantasi embrio dan juga mempunyai kontribusi untuk meningkatkan persentase keberhasilan implantasi

embrio transfer ( Fried and Wramsby, 1998 ). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa  $TGF\beta$  kemungkinan mempunyai efek yang penting pada masa preimplantasi embrio dan juga mempunyai kontribusi untuk meningkatkan persentase keberhasilan implantasi (Osterlund and Fried, 2000). Telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya bahwa efek dari  $TGF\beta$  pada preimplantasi embrio tikus adalah untuk meningkatkan *Total Cell Number* ( TCN ) ( Lin and Lodish, 1993 ).

Kemungkinan yang terjadi adalah cairan folikuler  $TGF\beta$  dapat meningkatkan *Total Cell Number*, dan juga memberi embrio untuk meningkatkan prosentase keberhasilan implantasi, dengan jalan interaksi media reseptor dengan oosit dan preimplantasi embrio ( Osterlund and Fried, 2000 ).

Sampai saat ini diketahui terdapat tiga tipe reseptor dari  $TGF\beta$ ,  $TGF\beta$  resptor tipe I, II, dan III ( $TGF\beta R$ -I,  $TGF\beta R$ -II,  $TGF\beta R$ -III ) ( Massague *et al.*, 1992, 1994; Lin and Lodish, 1993; Henis *et al.*, 1994; Lin and Moustakas, 1994 ). Dipercaya bahwa untuk sinyal kemunculan  $TGF\beta$ , keheterogenan diantara tipe I dan tipe II mutlak diperlukan ( Tang *et al.*, 1994 ). Tipe II binding reseptor  $TGF\beta$  menyebabkan perubahan konformasional yang mengacu pada ikatan dari kompleks  $TGF\beta$  reseptor tipe I terhadap reseptor tipe II ( Roy *et al.*, 1998). Kedua reseptor tersebut adalah serine-threonine kinase ( Roy *et al.*, 1998 ). Reseptor tipe III, sebuah proteoglikan, tidak terlibat secara langsung dalam kemunculan  $TGF\beta$  tetapi memberikan ikatan tersebut pada reseptor kemunculan.

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan selama kurang lebih tiga bulan di dua laboratorium yaitu di laboratorium fertilisasi In Vitro ( IVF ) dan laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### **3.2 Materi penelitian**

##### **3.2.1 Bahan penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari limbah Rumah Potong Hewan Krian. Bahan kimia yang diperlukan antara lain : Acrylamyd, Tris HCL pH 8,8, Tris HCL pH6,8, SDS 0,5%, Aquadest, Temed, APS 10%, E buffer, methanol 50%, methanol 5%, Acetic Acid 7,5%, Glutaraldehyd 10% NaOH 0,36%, NH<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub>, Zitronensoure 5%, Butanol.

##### **3.2.2 Alat penelitian**

Alat yang digunakan antara lain adalah : Spuit 5 cc, Cawan petri, Gentamisin, Pipet Pasteur, Pipet Evendorff, Tabung Evendorff, Alat sentrifus, Freezer, Inkubator, Aquadest steril, Tabung Erlenmeyer, Ultrasonic Homogenizer, Elektroforesis, Elektro buffer, Mikroskop.

### 3.2.3 Media Penelitian

Media yang dipakai dalam penelitian ini adalah : Media (*Tissue Culture Media*) TCM, Media (*Phosfat Buffer Saline*) PBS, (*Phosfat Zinc*) PZ. Bahan yang dipakai untuk pembuatan media (*Tissue Culture Media*) TCM adalah : TCM POW DET, NaHCO<sub>3</sub>, Gentamisin, (*Diionized Water*) DW, (*Bovine Serum Albumin*) BSA. Bahan yang dipakai untuk pembuatan Media (*Phosfat Buffer Saline*) PBS adalah : (*Phosfat Buffer Saline*) PBS, Antibiotik Gentamisin, (*Bovine Serum Albumin*) BSA.

## 3.3 Metode Penelitian

### 3.3.1 Persiapan Bahan / Media Maturasi

Media yang digunakan untuk maturasi sel – sel oosit dalam penelitian ini ada dua macam yaitu media (*Tissue Culture Media*) TCM dan media (*Phosfat Buffer Saline*) PBS.

### 3.3.2 Persiapan sampel oosit ( Ovarium )

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan Krian sebelumnya dibersihkan dulu dari darah dan lemak. Setelah dicuci dengan larutan PZ ovarium tersebut dimasukkan ke dalam botol yang sudah diisi media pembawa berupa larutan PZ dan gentamisin. Kemudian botol tersebut dimasukkan ke dalam termos pembawa yang sudah diisi air hangat.

### **3.3.3 Prosedur penelitian**

#### **3.3.3.1 Koleksi oosit**

Ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Krian tersebut dicuci terlebih dahulu sebanyak tiga kali pencucian dengan ditambahkan antibiotik setelah diambil dari botol dan media pembawa. Kemudian pada ovarium tersebut dilakukan aspirasi pada folikel – folikel oositnya. Aspirasi dilakukan pada folikel – folikel dominan yang mempunyai diameter 5 – 7 mm. Untuk proses aspirasi digunakan spuit suntik berukuran 5 cc yang sudah diberi PBS sebanyak 0,1 cc. Setelah diaspirasi, cairan folikel tersebut ditaruh pada cawan petri lalu dilihat dimikroskop untuk dipisahkan dari sel granulosa dan kotorannya. Setelah dipisahkan, oosit tersebut dimasukkan kedalam media TCM dan diinkubasi. Sel granulosa yang telah dipisahkan sebelumnya dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan di sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Setelah itu sel granulosa tersebut diambil supernatan dan cairannya dibuang lalu endapan tersebut dipindah ke dalam tabung ependorff dan dimasukkan ke dalam freezer.

#### **3.3.3.2 Maturasi ( Pematangan ) Oosit.**

Untuk proses pematangan oosit dipergunakan medium yang diberi tambahan FSH 0,01 mg/ml, BSA 3% dan gentamycin sulfat 50 ug/ml. Sepuluh sampai dua puluh oosit berdasarkan ukurannya dikultur dalam 100  $\mu$ l medium tetes dan ditutupi dengan mineral oil. Pematangan oosit dilakukan didalam

inkubator pada suhu 38,5 °c dengan tekanan CO<sub>2</sub> 5% selama 20 – 22 jam (Pawshe *et al.*, 1996 ).

### **3.3.3.3 Pengumpulan Oosit dan Penentuan Tingkat Kematangan Oosit**

Oosit yang telah dikelompokkan tersebut dipisahkan dari media pertumbuhannya dengan sebelumnya dilakukan pencucian dahulu dengan PBS<sup>-</sup> sehingga sewaktu dipindahkan kedalam tabung ependorff tidak ada sisa bahan kimia atau bahan pembawa yang bisa mengaburkan pembacaan pada SDS-Page. Pengelompokkan oosit yang telah dimaturasi tersebut dilakukan dibawah mikroskop inverted. Selanjutnya seluruh sampel yang telah dipisahkan dan dikelompokkan tersebut dipindahkan kedalam tabung ependorff dan disimpan didalam freezer.

### **3.3.3.4 Homogenisasi Sampel**

Sampel yang sudah diberi label dipindahkan ke ependorff kemudian ditambahkan PBS sebanyak 200 $\mu$ l. Begitu juga tabung ependorff yang berisi kontrol sebanyak 200 $\mu$ l larutan PBS<sup>-</sup> diberi perlakuan yang sama. Setelah semua sampel dan kontrol dipindah ke tabung ependorff maka dilakukan sonikasi dengan alat ultrasonik homogenizer dengan tujuan agar sampel di tiap tabung ependorff homogen dan tercampur dengan baik. Setiap tabung ependorff dilakukan sonikasi selama 2 x 15 detik.

### 3.3.3.5 SDS PAGE ( Elektrophoresis ).

Sampel yang telah disonikasi tersebut diberi pewarna biru sebelum dimasukkan ke dalam elektroforesis yang telah diisi larutan buffer elektroforesis. Sampel yang telah diberi pewarna dimasukkan ke dalam lubang *comb* pada agar elektroforesis tersebut. Pasang daya listrik pada 125v/40 mA, dan tunggu sampai sampel turun seluruhnya ( berada pada dasar agar ).

### 3.3.3.6 Tahap Pencucian

Tahap pencucian dilakukan empat kali perlakuan dengan bahan – bahan yang dipakai adalah : Methanol, Acetic Acid, Aquadest, Glutaraldehyd. Setiap tahap pencucian menggunakan konsentrasi dan bahan yang berbeda. Waktu yang dibutuhkan untuk setiap tahap pencucian adalah 30 menit kecuali pada tahap pencucian ke empat dibutuhkan waktu yang lebih lama.

### 3.3.3.7 Tahap Pewarnaan

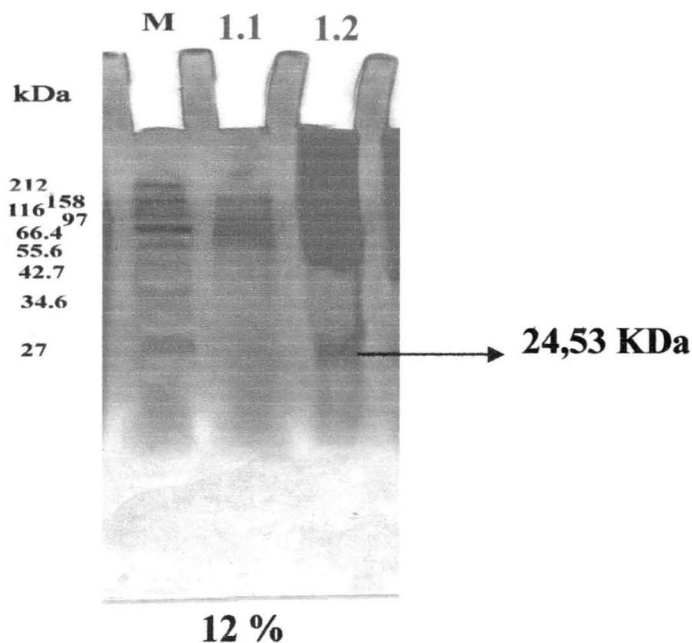
Tahap pewarnaan ini pewarnaan yang dipakai adalah *Coomasie blue*, dengan ditambah NaoH 0,36% sebanyak 21ml, aquadest 73,6 ml serta Amonium sol. 25%. Kesemua bahan dan agar tersebut dimasukkan kedalam petridish dan digoyangkan dengan kecepatan 42 x 15 menit. Pada tahap pewarnaan ini diberikan juga pengembang warna yang terdiri dari formaldehyd 37% sebanyak 50 $\mu$ l, zitonensaure 5% sebanyak 100  $\mu$ l dan aquadest sebanyak 100ml. Semua bahan tersebut diletakkan dalam cawan petri dan ditunggu lima menit sambil digoyangkan, sampai terlihat warna.



## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

Penelitian untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ), dilakukan analisis dengan menggunakan tehnik SDS-PAGE sehingga didapatkan hasil yang dinyatakan dalam satuan berat molekul yaitu KDa. Berdasarkan penghitungan persamaan regresi yang dihasilkan dari analisis statistik *marker* protein untuk menentukan berat molekul protein *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) diketahui 3 fraksi protein pada sumur *loading* pertama yaitu : 126,38 KDa; 116 KDa; 103,5 KDa. Pada sumur *loading* ke 2 didapatkan 3 fraksi protein yaitu : 124,38 KDa, dan 95,2 KDa, dan 24,53 KDa.



**Keterangan : 1.1 = Granulosa Immatur**

**2.1 = Oosit dengan Kumulus Komplek ( matur )**

## BAB V

### PEMBAHASAN

*Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Teknik ini lazim digunakan karena sederhana, murah, sampel yang digunakan relatif sedikit ( Rantam, 2003 ).

Prinsip dasar metode SDS-PAGE ini adalah elektroforesis protein dalam detergen ionic yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate* ( SDS ). Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS kompleks migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu ( Rantam, 2003 )

Zat lain yang digunakan dalam elektroforesis adalah (Tetrametilendiamina) TEMED sebagai inisiator terjadinya polimerisasi, dan (*Amoniumm Persulphate*) APS sebagai katalisator. Pemberian Temed dan APS harus disesuaikan dengan kebutuhan karena apabila terlalu banyak selain dapat menyebabkan teroksidasinya protein, juga dapat menyebabkan perubahan pada buffer, sedangkan bila pemakaian APS terlalu sedikit dapat memperlambat reaksi sehingga polimerisasi akan berjalan lambat, selain itu pemilihan konsentrasi gel yang dapat menentukan keberhasilan pemisahan fraksi protein karena konsentrasi gel maka pori yang terbentuk semakin kecil. Pencucian dengan E. buffer bertujuan untuk menghantarkan listrik agar cairan sampel dapat turun ke bawah.

Pemberian asam asetat diperlukan untuk menghentikan reaksi agar pewarnaan tidak terlalu gelap sehingga dapat terbaca.

Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE didapatkan beberapa fraksi protein. Pada sumur loading pertama terdapat 3 fraksi protein yaitu : 126,38 KDa; 116 KDa; 103,5KDa. Sedangkan pada sumur loading ke 2 terdapat 3 fraksi protein yaitu : 124,3 KDa; dan 95,2 KDa dan 24,53 KDa. Protein – protein tersebut kemungkinan berasal dari sel granulosa oosit sapi.

Preparasi sampel yang diambil dari sel granulosa immatur tampaknya tidak ditemukan fraksi protein *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ), hal ini tampak pada penghitungan berat molekul fraksi – fraksi protein tidak ada yang identik dengan berat molekul *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) sebesar 25 KDa.

Preparasi sampel yang diambil dari oosit dengan kumulus kompleks menunjukkan adanya satu fraksi protein yang diduga adalah *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ), yaitu dengan berat molekul 24,53 KDa. Protein tersebut identik dengan fraksi protein yang ditemukan oleh Masague *et al.* (1992) dengan berat molekul 25 KDa sebagai *Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ).

Berat molekul protein yang ditemukan tersebut identik dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Masague (1994) serta Yang dan Roy (2001) yaitu *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$  ) termasuk famili polipeptida berantai-rantai disulfida dengan berat molekul sebesar 25 kDa.

*Transforming Growth Factor  $\beta$*  ( TGF  $\beta$  ) yang teridentifikasi hanya didapatkan pada sampel yang terdiri dari oosit dengan kumulus kompleks, yaitu

oosit yang telah melalui tahap maturasi, diduga dihasilkan oleh sel – sel granulosa sebagaimana hasil laporan penelitian yang dilakukan oleh Hamid dan Widjiati (2004).

Hasil elektroforesis pada gambar terlihat kurang jelas dan masih didapatkan smear, hal ini terjadi karena protein yang dipakai belum dilakukan pemurnian dan dipecah lagi menjadi bagian yang terkecil, kemungkinan pada tahap sonikasi pengerjaannya belum sempurna.

Hasil penelitian perlu dilakukan uji lanjutan seperti ELISA, diharapkan protein yang bersifat imunogenik dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pengembangan bahan antigen atau antibodi.

Protein dengan berat molekul yang lebih besar kemungkinan bersifat lebih imunogenik dan dapat digunakan sebagai antigen, tetapi tidak menutup kemungkinan bahwa yang tipis dapat bersifat imunogenik. Tizard ( 1982 ) menyatakan bahwa salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat adalah besar molekul, dan struktur molekul. Menurut Bellanti ( 1993 ) zat yang imunogenik selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu imunogenik.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil fraksinasi protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( TGF  $\beta$  ). Dengan metode SDS-PAGE didapatkan 3 fraksi protein pada sumuran pertama yaitu : 126,38 KDa; 116 KDa; 103,5 KDa. Pada Sumuran 2 didapatkan 3 fraksi protein yaitu 124,3 KDa dan 95,2 KDa dan 24,53 KDa. Berdasarkan hasil penghitungan persamaan regresi yang dihasilkan dari analisis statistik dari marker protein maka dapat diketahui berat molekul protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( TGF  $\beta$  ) adalah : 24,53 KDa.

#### 6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari hasil penelitian diatas adalah perlunya dilakukan pemurnian protein dan perlu penelitian lebih lanjut dengan imunoblotting untuk mengetahui protein yang antigenik.

## RINGKASAN

**MEIRIO ALFATONA.** Identifikasi dan karakterisasi *Transforming growth factor*  $\beta$  ( TGF  $\beta$  ) Sebagai Bahan Yang Berperan Pada Proses Pematangan Dan Diferensiasi Oosit Sapi dibawah bimbingan Bapak Husni Anwar, drh sebagai pembimbing pertama dan Bapak Iwan Sahrial, M.Si., drh sebagai pembimbing kedua.

*Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) dibentuk dari sejumlah protein yang secara potensial berperan dalam regulator intraovari dan fungsi ovari. TGF  $\beta$  merupakan faktor diferensiasi dan pertumbuhan sama seperti halnya dengan faktor tumbuh kembang faktor - 9 (GDF - 9). *Mullerian Inhibitory Substance* ( MIS ), Activin dan Inhibin. TGF  $\beta$  mempunyai fungsi menjaga kualitas oosit untuk dipakai dalam produksi embrio *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein TGF  $\beta$  dari granulosa immatur dan oosit dengan kumulus kompleks (okk matur) yang dinyatakan dalam berat molekul dan diharapkan sebagai protein imunogenik yang dapat digunakan sebagai antibodi monoklonal untuk kepentingan dalam bidang transfer embrio.

Ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Krian dilakukan aspirasi pada folikel oositnya, kemudian diekstraksi dengan tehnik sonikasi. Identifikasi fraksi protein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) dilakukan dengan proses *Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel*

*Electrophoresis* ( SDS-PAGE ), yang kemudian hasilnya dinyatakan dalam satuan berat molekul KDa.

Hasil penelitian didapatkan beberapa fraksi protein. Pada sumur *loading* pertama terdapat 3 fraksi protein yaitu : 126,38 KDa; 116 KDa; 103,5KDa. Sedangkan pada sumur *loading* ke 2 terdapat 3 fraksi protein yaitu : 124,3 KDa; dan 95,2 KDa dan 24,53 KDa. Protein – protein tersebut kemungkinan berasal dari sel granulosa oosit sapi.

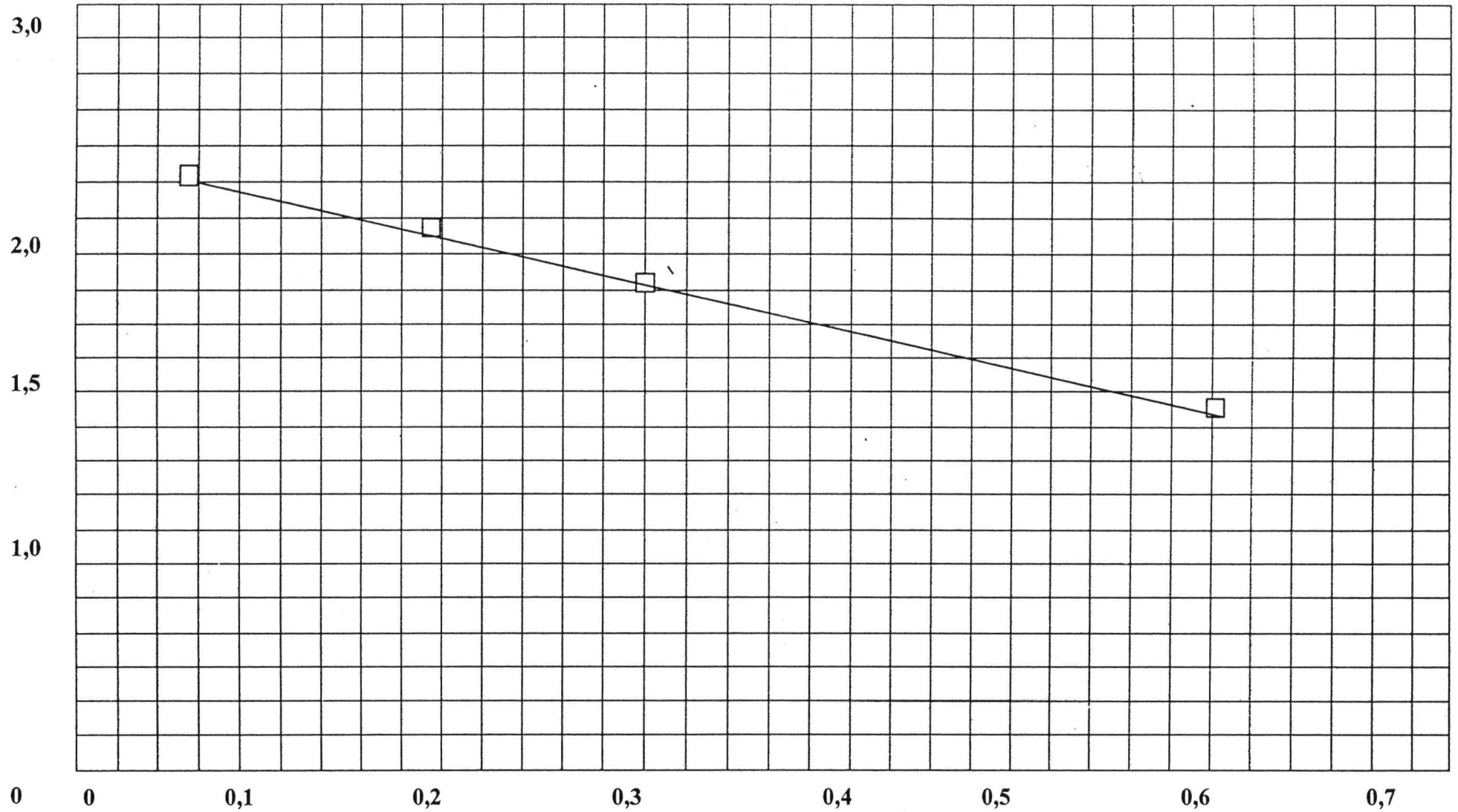
## DAFTAR PUSTAKA

- Bellanti. 1993. *Immunologi III ( Terjemahan )*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Boediono A., Suzuki T., Li L.Y. and Godke RA.. 1999. *Offspring born from chimeras recomnstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embriyos*. *J. Mol Reprod. Dev*, 53:159-170.
- Glister, C, Groome Nigel P, Knight Philip G. 2003. *Oocyte Mediated Supression of follicle – Stimulating Hormone – and Insulin Like Growth Factor – Induced Secretion of Steroids and Inhibin – Related Protein by Bovine Granulosa Cells In Vitro : Possible Role of Transforming Growth Factor  $\alpha$* . *J. Biol Reprod*. 68 : 758 – 765.
- Godkin J.D. and J.J.E. Dore. 1998. *Transforming Growth Factor Beta and The Endometrium*. *Rev. Reprod*. 3 : 1 – 6.
- Fried, G. and Wramsby, H. 1998. *Increase in Transforming Growth Factor Beta in Ovarian Follicular Fluid Following Controlled Ovarian Hyperstimulation and in vitro Fertilization Correlates to Pregnancy*. *J. Hum. Reprod.*, 13, 656 – 659.
- Fried, G., Wramsby, H. and Tally, M. 1998. *Transforming Growth Factor Beta 1, Insulin Like Growth Factors, and Insulin Like Growth Factor Binding Proteins in Ovarian Follicular Fluid are differentially Regulated by The type of Ovarian Hyperstimulation used for in vitro Fertilization*. *J. Fertil. Steril.*, 70, 129 – 134
- Hamid , I.S., dan Widjiati. 2004. *Ekspresi Reseptor Transforming Groth Factor  $\beta$  pada oosit dengan sel kumulus kmpleks dalam rangka produksi embrio sapi*. Laporan akhir hasil penelitian Hibah Pekerti Angkatan II, Tahun I / 2004.
- Henis, Y.L., Moustakas, A., Lin H.Y. and Lodish, H.F. 1994. *The Types II and III Transforming Growth Factor – Beta Receptors form Homoligomers*. *J. Cell. Biol.*, 126, 139 – 154.
- Hyttel, P., I, Fair, H. Callsen and I. Greve. 1997. *Oocyte growth, Capacitation and Final Maturation in Cattle*. *J. Theriogenology*. 47 : 23 – 32.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Edisi II. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.



- Leese. H.J. 1995. *Metabolic control during preimplantation mamalian development*. J. Human Reprod. 1 (1) : 63-72.
- Lin, H.Y and Lodish, H.F. 1993. *Receptors for the TGF – beta superfamily*. Trends Cell Biol., 3, 14 – 19.
- Lin, H.Y. and Moustakas, A. 1994. *TGF – Beta Receptors : Structure and Function*. Cell. Mol. Biol., 40, 337 – 349.
- Massague, J., Andreas., J., Attissano, L. et al. 1992. *TGF – Beta Receptors*. Mol. Reprod. Dev., 32, 99 – 104.
- Massague, J., Attisano, L. and Wrana, J.L. 1994. *The TGF – beta family and its composite receptors*. Trends Cell Biol., 4, 172 – 178.
- Okadome, T., Yamashita, H., Franzen, P. et al. 1994. *distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor – beta type I and Type II receptors in signal Transduction*. J. Biol. Chem., 269, 30753 – 30756.
- Osterlund C. and G. Fried. 2000. *Tgf beta receptor type I and II and the substrate protein smad 2 and 3 are present in human oocyte*. J. Mol. Hum. Reprod. 6 ( 6 ) : 498 – 503.
- Pawshe, C. H., A. Palanisamy, Taniju, S.K. Jain and S. M. Totey. 1996. *Comparison of various maturation treatment on in vitro maturation of good oocytes and their early embryonic development and cell number*. J. Theriogenology. 46 : 971 – 982.
- Roy S.K., S.G Kurz, A.M.Carlson, C.J. De Jonge. J.W. Ramey and V.M. Maclin.1998. *Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor in Hyperstimulated Human Granulosa Cells and Cleavage Potential of Thhe Zygotes* 59 : 1311 – 1316.
- Rantam, F.A., 2003. Metode Imunologi. Airlangga UniversityPress, Surabaya.
- Tang Y.M., Y.Zhao, M.J. Rossi, R.S.Abu-Rustum, G.A. Ksander and N.Chegini. 1994. *Expression of transforming growth factor  $\beta$  isoform and TGF type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF $\beta$  on endometrial stromal cell growth and protein degradation in vitro*. J.Endocr. 135 : 450 – 459.
- Thomas, F.H. Armstrong, D.G, Telfer, E.E. 2003. *Activin promotes oocyte development in ovine preant follicles in vitro*. J. Reprod. Endoc. 1 : 76.

- Tizzard, I.R. 1982. *An introduction to Veterinary Immunology*. 2<sup>nd</sup> Ed. W.B. Saunders Company. Ontario, Canada.
- Yang P. and S.K. Roy. 2001. *Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster prenatal follicles in vitro*. *J. Biol. Reprod.* 65 : 847 – 854.
- Widjiati dan Rimayanti, 2001. Seleksi ukuran folikel terhadap profil transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi in vitro. *Media Kedokteran Hewan* 18 : 79 – 85
- Widjiati dan Rimayanti. 2002. Seleksi diameter folikel terhadap morfologi embrio kambing tahap satu sel dan angka fertilisasi in vitro. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.



Grafik Marker Potein *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( TGF  $\beta$  )

### LAMPIRAN 1 :Kurva Hubungan RF dengan log. BM Protein Standard

- $$RF = \frac{\text{Jarak pita protein dari sumuran}}{\text{Jarak dari awal loading sampai ke dasar sumuran}}$$

- **Marker**

Jarak dari awal loading sampai ke dasar sumuran = 52 mm

1. Untuk pita protein 212 KDa	→	$RF = 8 / 52$	= 0,15 mm
2. Untuk pita protein 158 KDa	→	$RF = 11 / 52$	= 0,21 mm
3. Untuk pita protein 116 KDa	→	$RF = 12 / 52$	= 0,23 mm
4. Untuk pita protein 97 KDa	→	$RF = 15 / 52$	= 0,28 mm
5. Untuk pita protein 66,4 KDa	→	$RF = 17 / 52$	= 0,33 mm
6. Untuk pita protein 55,6 KDa	→	$RF = 20 / 52$	= 0,38 mm
7. Untuk pita protein 42,7 KDa	→	$RF = 24 / 52$	= 0,46 mm
8. Untuk pita protein 34,6 KDa	→	$RF = 27 / 52$	= 0,52 mm
9. Untuk pita protein 27 KDa	→	$RF = 33 / 52$	= 0,63 mm

- **Sumuran I ( Granulosa immatur )**

1. $RF = 10 / 52$	= 0,19
2. $RF = 13 / 52$	= 0,25
3. $RF = 16 / 52$	= 0,31

- **Sumuran II ( Oosit dengan kumulus kompleks ( matur ) )**

1.  $RF = 11 / 52 = 0,21$

2.  $RF = 18 / 52 = 0,35$

3.  $RF = 36 / 52 = 0,69$

- Dari data yang didapatkan pada marker, dimasukkan pada persamaan linier dimana koefisien  $X = RF$  marker dan  $Y = Protein$  Marker , maka didapatkan persamaan :  $Y = 167,945 - 207,836( X )$

**Hasil :**

- **Sumuran I**

1. 126,38 KDa

2. 116 KDa

3. 103,5 KDa

- **Sumuran II**

1. 124,3 KDa

2. 95,2 KDa

3. 24,53 KDa

## LAMPIRAN 2 : CARA KERJA SDS PAGE

### SDS\_PAGE 12%

1. Bahan – bahan yang diperlukan :

Acrilamid	Tris HCL ph 8,8	Tris HCL pH 6,8
SDS 0,5%	Aquadest	Temed
APS 10%, 4°C Buffer		Methanol 50%
Methanol 5%	Acetic Acid 7,5%	Glutaraldehyd 10%
NaOH 0,36%	NH3	AgNO3
Formaldehide	Zitronensoure 5%	Butanol

2. Membuat *Running Gel*

Bahan :	Acrilamid	2,5 ml
	Tris HCl pH 8,8	1,2 ml
	SDS 0,5%	1,2 ml
	Aquadest	1,1 ml
	Temed	5,0 $\mu$ l
	APS 10%	30 $\mu$ l

1. Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas.

2. Tambahkan butanol diatasnya sampai penuh.

3. Membuat *Stacking Gel*

Bahan :	Acrilamid	0,66 ml
	Tris HCl pH 6,8	0,80 ml

SDS 0,5 %	0,80 ml
Aquadest	0,80 ml
Temed	4,0 $\mu$ l
APS 10%	2,0 $\mu$ l

4. Masukkan ke atas cetakan Running Gel sampai penuh kemudian masukkan *comb* ke *stacking gel* dan inkubasi selama 25 menit.
5. Siapkan sampel ( laemmli buffer + Sampel ) masukkan ke dalam ependorff dan tutup ependorff ditusuk dengan jarum  $\frac{1}{2}$  tusukan, langsung rebus dengan  $100^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit.
6. Setelah inkubasi selesai lepaskan *comb* dan cuci dengan E Buffer 1X.
7. Masukkan cetakan tadi ke BioRad
8. Tuangi dengan E Buffer 1X ( 800 ml )
9. Masukkan sampel ke dalam lubang *comb* tadi dan hilangkan gelembung udara tadi dengan jarum.
10. Pasang listrik dengan 125 V dan 40 mA.
11. Tunggu sampai sampel turun seluruhnya
12. Matikan listrik dan lepas agarnya pelan – pelan.
13. Masukkan ke petridish yang sudah diisi larutan pencuci sebelumnya.
14. Tahap pencucian

Pencucian I : Methanol	25 ml
Asam Asetat	3,75 ml
Aquadest	71,25 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian II : Methanol 3,75 ml

Asam aseta 25 ml

Aquadest 71,25 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian III : ( Glutaraldehyde 10 % )

Glutaraldehyde 10 ml

Aquadest 90 ml

Pencucian IV : Cuci dengan aquadest @ 100 ml 3X selama 30 menit

15. Tahap Pewarnaan

Timbang  $\text{AgNO}_3$  0,8g + 4 ml DW, campur dan masukkan ke dalam

larutan yang terdiri dari : NaOH 0,36% 21 ml

NH<sub>3</sub> 1,4 ml

Aquadest 73,5 ml

Masukkan kedalam *petridish* dan goyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit. Setelah itu buang.

16. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2X selama 2 menit

17. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

Formaldehid 3,7% 50  $\mu\text{l}$

Zitronensoure 5% 100  $\mu\text{l}$

Aquadest 100 ml

Tunggu 5 menit sambil digoyang terus

18. Masukkan *stop* reaksi dengan Acetic Acid 10%



19. Cuci dengan Aquadest @ 100 ml 2X selama 2 menit

20. Beri Glicerol 10%

Glicerol        10 ml

Aquadest       90ml

**LAMPIRAN 3 : BAHAN / MEDIA MATURASI SEL OOSIT**

## 1. Media TCM

- TCM + PZ + Gentamisin

➤ TCM 100 ml : TCM POW DET 0,95 g

NaHCO<sub>3</sub> 0,22 g

Gentamisin 1,0  $\mu$ l / ml

DW 100 ml

BSA 0,03 g ( dimasukkan terakhir dan tidak  
boleh digoyang )

## 2. Media PBS

➤ PBS 100 ml

Antibiotik 1,0  $\mu$ l / ml

BSA 0,03 g ( dimasukkan terakhir dan tidak boleh digoyang )