

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Spermatozoa kambing diambil dari peternak dan dikumpulkan di Laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Membran plasma spermatozoa disiapkan di TDC (*Tropical Disease Center*) Universitas Airlangga Surabaya. Pemberian perlakuan hewan percobaan dilakukan di Kandang Hewan Percobaan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah 40 ekor mencit (*Mus musculus*) betina yang sudah dewasa kelamin dan sudah pernah beranak, dengan berat badan 30-40 gram dan diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spermatozoa kambing. Bahan-bahan untuk preparasi membran plasma spermatozoa kambing adalah PBS (*Phosphate Buffer Saline*), PMSF (*Phenil Methyl Sulfonyl Florid*), BME (*Betha Mercapto Ethanol*), EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*), Natrium

Hidrogen, NaCl. Sedangkan *Complete Freund Adjuvant* dan *Incomplete Freund Adjuvant* sebagai pelarut untuk imunisasi mencit. Makanan mencit berupa pakan ayam dan air untuk minum mencit.

3.2.3. Alat- Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit berjumlah 15 buah yang terbuat dari kotak plastik persegi empat dengan tutup dari kawat; tempat minum dari botol; vagina buatan kambing sebagai tempat penampungan semen yang berisi spermatozoa; tabung reaksi; tabung eppendorf; mikropipet; alat sentrifuse; spektrofotometer; vortex; skalpel, pinset, gunting bedah dan bak seksi untuk membedah mencit; timbangan mikro untuk menimbang berat ovarium; jangka sorong mikro untuk mengukur panjang uterus dan panjang serviks.

3.3. Metode penelitian

3.3.1. Rancangan penelitian

Rancangan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sejumlah 40 ekor mencit (*Mus musculus*) betina tersebut dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, setiap kelompok mendapat perlakuan yang berbeda. Data yang terkumpul diuji secara statistik sehingga kemudian dapat diambil suatu kesimpulan dari hasil penelitian ini.

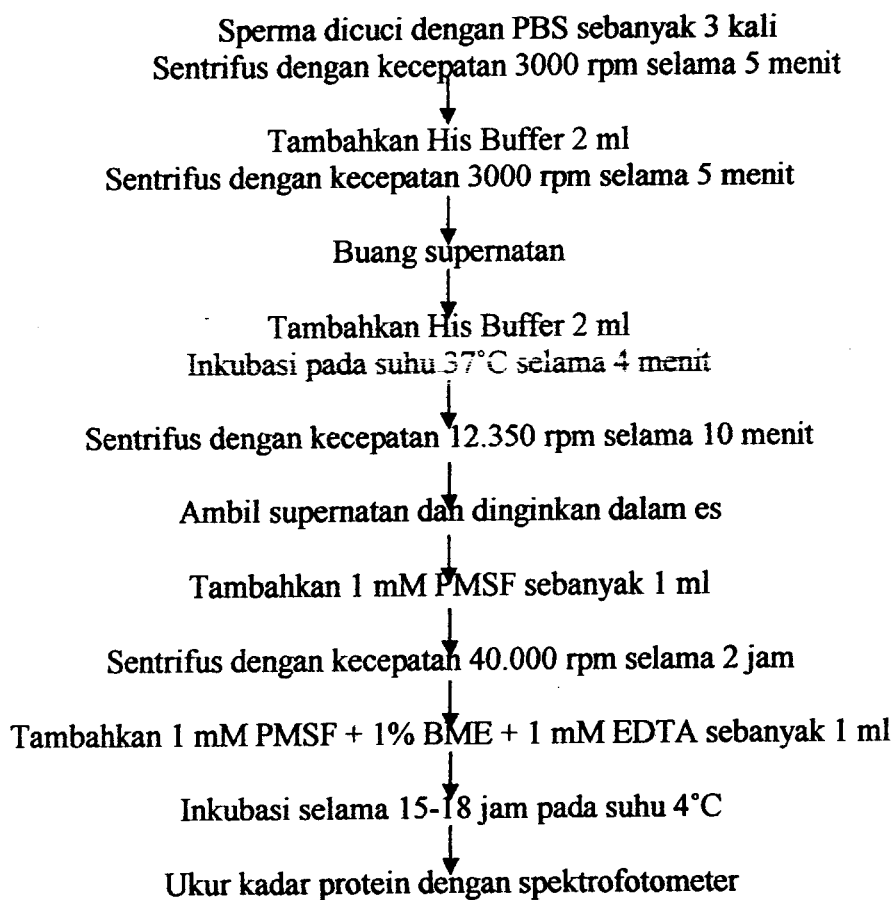
3.3.2. Persiapan Hewan Coba

Mencit sebagai hewan percobaan diadaptasikan dahulu selama 21 hari agar dapat menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan dan untuk mengetahui apakah tidak ada hewan coba yang bunting sebelum perlakuan. Pakan dan minuman diberikan secukupnya, dan ruangan tempat pemeliharaan mencit diusahakan agar selalu dalam keadaan bersih.

3.3.3. Penyiapan Membran Plasma Spermatozoa

Penampungan semen kambing dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Proses preparasi membran plasma spermatozoa dilakukan menurut metode Banarjee and Chowdury (1997), ejakulat dalam tabung kerucut (*cone tube*) ditambah dengan 5 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Selanjutnya selama 10 menit disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian supernatan dibuang dan diulangi sebanyak 2 kali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Tahap selanjutnya, 1 ml endapan spermatozoa yang diperoleh dicuci kembali ditambah lagi dengan PBS kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian suspensi spermatozoa yang diperoleh diberi *His Buffer* sebanyak 2 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang, ditambahkan *His Buffer* sebanyak 2 ml, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 menit. Selanjutnya supernatan yang diperoleh disentrifuse dengan kecepatan 12.350 rpm selama 10 menit. Setelah itu, supernatan didinginkan dan kemudian ditambah dengan 1 mM PMSF (*Phenyl Methyl Sulfonyl Florid*) sebanyak 1 ml dan disentrifus kembali dengan kecepatan

40.000 rpm selama 2 jam, supernatan diambil dan supernatan tersebut ditambah larutan yang berisi 1 mM PMSF (*Phenil Methyl Sulfonil Florid*), 1% BME (*Betha Mercapto Ethanol*), dan 1 mM EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) sebanyak 1 ml. Inkubasi pada suhu 4°C selama 15-18 jam. Setelah itu mengukur kadar protein dengan menggunakan spektrofotometer. Prosedur preparasi membran plasma spermatozoa kambing dapat diringkas seperti pada skema dibawah ini:



Gambar 3.1. Skema proses preparasi membran plasma spermatozoa (Benerjee and Chowdury, 1997)

3.3.4. Perlakuan Hewan Coba

Kelompok kontrol (P0) tidak dikawinkan sedangkan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) dikawinkan.

Imunisasi dengan membran plasma spermatozoa kambing dengan dosis sebagai berikut:

1. Kelompok mencit kontrol (P0), diberi suntikan NaCl fisiologis 0,1 ml.
2. Kelompok mencit perlakuan I (P1), diberi suntikan campuran antara 0,05 ml suspensi yang mengandung 10 μ g membran plasma spermatozoa dengan 0,05 ml adjuvant.
3. Kelompok mencit perlakuan II (P2), diberi suntikan campuran antara 0,05 ml suspensi yang mengandung 20 μ g membran plasma spermatozoa dengan 0,05 ml adjuvant.
4. Kelompok mencit perlakuan III (P3), diberi suntikan campuran antara 0,05 ml suspensi yang mengandung 40 μ g membran plasma spermatozoa dengan 0,05 ml adjuvant.

Penyuntikan pertama menggunakan *Complete Freund Adjuvant* (CFA). Pemberian booster dilakukan pada hari yang ke 14 dan ke 28 setelah penyuntikan pertama dengan *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) sebagai pelarut, hal ini karena titer antibodi tertinggi terhadap protein yang larut dapat dicapai dalam 8-12 hari setelah penyuntikan pertama (Bellanti, 1993).

Pada hari ke-21 setelah booster II dilakukan pembedahan untuk pengukuran biometri organ reproduksi, yaitu berat ovarium (dalam mg), panjang

serviks (dalam mm) dan panjang uterus (dalam mm) mencit (*Mus musculus*) betina.

3.3.5. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah perubahan biometri alat kelamin (berat ovarium, panjang serviks dan uterus) pada mencit kelompok perlakuan dengan dosis penyuntikan 10 μg , 20 μg dan 40 μg yang merupakan hasil preparasi membran plasma spermatozoa kambing dibanding dengan mencit kelompok kontrol.

3.4. Analisis Data

Data yang terkumpul diuji dengan analisis statistik. Analisis data yang digunakan untuk mengetahui pengaruh imunisasi dengan suspensi membran plasma spermatozoa kambing dalam *freund adjuvant* terhadap mikrobiometri alat kelamin diuji dengan menggunakan *Oneway Anova* pada tingkat kepercayaan ($\alpha=5\%$). Apabila dalam uji *Oneway Anova* tersebut terdapat perbedaan yang nyata ($p<0,05$), maka akan dilanjutkan dengan Post Hoc Test dari SPSS versi 12 (Andi, 2004).