

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini ingin diketahui pengaruh penambahan urea ke dalam media maturasi terhadap ekspresi TNF- dan IL-1 oosit sapi. Semua oosit dimaturasi dengan menggunakan media maturasi yang ditambahkan PMSG, hCG, dan FBS (kontrol); urea dengan dosis 20 mg/dl (perlakuan 1); urea dengan dosis 40 mg/dl (perlakuan 2). Eksperimen 1 mengevaluasi maturasi oosit sapi yang dilakukan selama 24 jam. Eksperimen 2 mengevaluasi ekspresi TNF- pada oosit sapi dengan pewarnaan imunositokimia dan eksperimen 3 dilakukan untuk mengevaluasi ekspresi IL-1 pada oosit sapi dengan pewarnaan imunositokimia. Data yang diperoleh dianalisis secara analitik parametrik.

4.2 Populasi dan Besar ulangan

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH), selanjutnya ovarium dibawa ke laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan koleksi sampel oosit dan maturasi oosit.

4.2.2 Besar Ulangan

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus Federer (1963) dalam Kusriningrum (2011):

$$t(n-1) > 15$$

-t = kelompok perlakuan

-n= jumlah ulangan

Jumlah ulangan dalam penelitian ini adalah :

$$t(n-1) = 15$$

$$3(n-1) = 15$$

$$3n = 18$$

$$n = 6$$

Dengan rumus diatas, didapatkan jumlah ulangan 6 untuk 3 perlakuan. Jadi dalam penelitian ini akan dilakukan maturasi sebanyak 6 kali untuk setiap perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (Independent variable)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis urea pada medium maturasi.

4.3.2 Variable tergantung (Dependent variable)

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu ekspresi TNF- α , IL-1 dan jumlah oosit matur.

4.3.3 Variable Terkendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah medium maturasi (TCM-199), FBS, kanamycin, PMSG, hCG, Inkubator CO₂, lama maturasi, temperatur, konsentrasi gas, kelembapan, metode pemeriksaan ekspresi TNF- α dan IL-1.

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Medium maturasi yang dimaksud dalam penelitian ini adalah cairan yang mengandung bahan-bahan seperti TCM-199, Kanamycin monosulphate, HEPES, Fetabl bovine serum, hormone PMSG, HCG dan Sodium bicarbonate yang berfungsi untuk proses pematangan oosit.
- b. Medium *dissection* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah cairan yang mengandung bahan-bahan seperti TCM-199, Kanamycin monosulphate dan HEPES yang berfungsi untuk koleksi dan seleksi oosit.
- c. Urea dalam penelitian ini adalah urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) yang ditambahkan pada media maturasi *in vitro*.
- d. Ekspresi TNF- yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ekspresi salah satu sitokin mediator seluler yang bernama Tumor Necrosis Factor- yang terlihat pada oosit yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada bagian inti, sitoplasma hingga membran oosit dengan pewarnaan imunositokimia.
- e. Ekspresi IL-1 yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ekspresi salah satu sitokin mediator seluler yang bernama Interleukin-1 yang terlihat pada oosit yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada bagian inti, sitoplasma hingga membran oosit dengan pewarnaan imunositokimia.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit hasil aspirasi folikel ovarium sapi yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH), medium kultur *in vitro* (TCM-199, GibcoBRL®), HEPES (Sigma-Aldrich®) yang disimpan pada suhu 4–5°C serta mempunyai PH 7,2, *mineral oil*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Sigma®, St. Louis USA), Fetal bovine serum (FBS), Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), Kanamycin sulfate (Bioplus), *Pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) (PG600®, Canada), *Hormone chorionic gonadotropin* (hCG) (PG600®, Canada), urea (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), aquadest steril, Alkohol 70%, *disposable petridish* steril (diameter 35, 60, dan 100 mm) (Nuclon), NaCl fisiologis, hyaluronidase, asam asetat-alkohol 25%, pewarna aceto-orsein 1%, Antibodi anti-TNF- α , Antibodi anti-IL-1, hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%, *counter staining Methyl green*, paraffin wax, vaseline, glycerine, perekat, object glass dan cover glass.

4.5 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator CO² yang dilengkapi pengatur suhu dan konsentrasi gas CO² (Thermolyne), mikroskop dissecting (Olympus, SZ61), *inverted microscope* (Olympus), *laminar air flow*, Osmometer (Cryobasic), pH meter (Sartorius, PB-10), labu ukur (250 ml dan 500 ml), pinset, *beaker glass* (500 ml dan 250 ml), *syringe disposable* (1 ml, 5 ml dan 10 ml), gunting bengkok, syringe filter (0,2 μ m), jarum 18G, mikropipet (Eppendorf), slide staining jar, mikropipet gelas.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Koleksi oosit dari ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH), maturasi oosit *in vitro* dan perhitungan persentase oosit yang matur dilakukan di sub-laboratorium Fertilisasi *in Vitro*, Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat Imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu Penelitian dari bulan Agustus hingga November 2019.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data (sumber prosedur)

4.7.1 Aspirasi Oosit

Ovarium sapi dibawa dari RPH dalam termos stainless. Ovarium dipotong dan dipisahkan dari jaringan lain. Ovarium yang sudah terpisah yang mempunyai tampilan yang sehat dicuci dengan NaCl fisiologis hangat dengan suhu 39°C. Cairan folikel diaspirasi dari folikel yang mempunyai diameter 2-6 mm dengan menggunakan syringe 10 ml dan jarum 18 gauge yang berisi media koleksi.

Cairan hasil aspirasi didiamkan selama 5-10 menit di dalam tabung yang sudah terisi media *dissection* untuk memisahkan oosit serta menghilangkan sisa-sisa cairan folikel. Cairan hasil aspirasi diambil hingga hampir habis tersisa sedikit bagian di dasar tabung, sisa cairan dalam tabung dituang pada petri dish 100 mm yang sudah diberi garis bantu. Dengan menggunakan mikroskop *dissecting* dengan perbesaran 120-240x, dilakukan seleksi dan pencucian

cumulus oocyte complexes (COCs) yang mempunyai sitoplasma homogen serta masih mempunyai minimal 3 lapis sel cumulus padat. Hasil seleksi dipindahkan ke media koleksi di petri dish 60 mm, lalu diseleksi kembali dan COC dipindahkan ke media *dissection* di petri dish 35 mm.

4.7.2 Maturasi Oosit in Vitro

Cumulus oocyte complexes (COCs) yang sudah diseleksi dari media koleksi dipindahkan ke dalam tetes (drop) media maturasi. Media yang digunakan adalah media TCM-199 yang ditambah PMSG 0,15 IU/ml, hCG 0,15 IU/ml, Fetal bovine serum (FBS) 10%. Setiap *petridish* berisi tiga drop media maturasi 150 µl/drop yang dilapisi *mineral oil* kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5%, kelembaban 95%, suhu 39°C selama 24 jam.

4.7.3 Perlakuan pada Maturasi Oosit

Kontrol (P0) : Maturasi oosit dalam media maturasi tanpa suplementasi urea.

Perlakuan 1 (P1) : Maturasi oosit dalam media maturasi dengan suplementasi urea 20 mg/dl.

Perlakuan 2 (P2) : Maturasi oosit dalam media maturasi dengan suplementasi urea 40 mg/dl.

4.7.4 Identifikasi Ekspresi TNF- dengan Metode Imunositokimia

Oosit yang telah dimaturasi selama 24 jam diletakkan pada gelas objek kemudian aspirasi cairan sisa disekitar oosit, tutup dengan cover glass secara perlahan agar oosit tidak tertekan atau rusak lalu masukkan ke dalam larutan fiksatif (metanol 100%) selama 15 menit pada suhu -20°C . Kemudian cuci bilas dengan PBS 10% tiga kali selama 5 menit tiap pencucian. Dilanjutkan dengan H_2O_2 3% diteteskan dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan PBS 10%. Teteskan $0,1 \mu\text{l}$ antibody anti TNF- (pengenceran 1:3) diteteskan pada area marking oosit, inkubasi pada magnetic immunostaining dalam keadaan tertutup selama 1 jam, cuci dengan Tris buffer selama 5 menit, isapkan tisu di sekitar area oosit, teteskan HRP (streptavidin) selama 10 menit, isapkan tisu di sekitar area oosit, cuci dengan Tris buffer selama 5 menit, teteskan DAB selama 10 menit, cuci dengan air mengalir selama 5 menit. Masukkan preparat ke dalam pewarna Methylene blue selama 2 menit, cuci dengan air mengalir selama 5 menit. (Laboratorium Dept. Vet. Patologi FKH Unair, 2016).

4.7.5 Identifikasi Ekspresi Interleukin-1 dengan Metode Imunositokimia

Oosit yang telah dimaturasi selama 24 jam diletakkan pada gelas objek kemudian aspirasi cairan sisa disekitar oosit, tutup dengan cover glass secara perlahan agar oosit tidak tertekan atau rusak lalu masukkan ke dalam larutan fiksatif (metanol 100%) selama 15 menit pada suhu -20°C . Kemudian cuci bilas dengan PBS 10% tiga kali selama 5 menit tiap pencucian. Dilanjutkan dengan H_2O_2 3% diteteskan dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan PBS

10%. Teteskan 0,1 µl antibody anti IL-1 (pengenceran 1:3) diteteskan pada area marking oosit, inkubasi pada magnetic immunostaining dalam keadaan tertutup selama 1 jam, cuci dengan Tris buffer selama 5 menit, isapkan tisu di sekitar area oosit, teteskan HRP (streptavidin) selama 10 menit, isapkan tisu di sekitar area oosit, cuci dengan Tris buffer selama 5 menit, teteskan DAB selama 10 menit, cuci dengan air mengalir selama 5 menit. Masukkan preparat ke dalam pewarna Methylene blue selama 2 menit, cuci dengan air mengalir selama 5 menit. (Laboratorium Dept. Vet. Patologi FKH Unair, 2016).

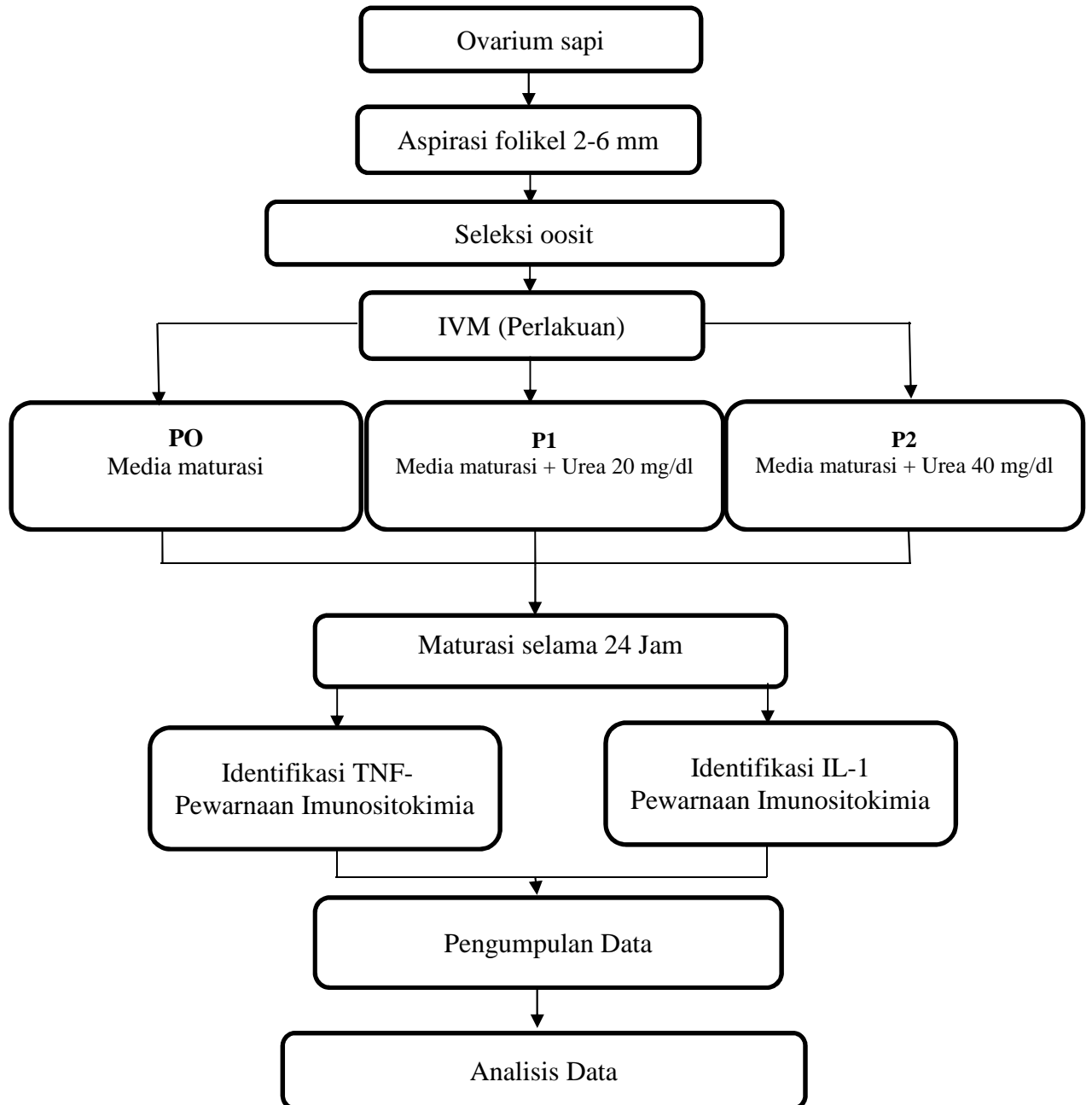
4.7.6 Penghitungan Oosit matur Dengan Pewarnaan Aceto-orcein

Perhitungan persentase oosit matur berdasarkan fase metaphase II dapat dilakukan dengan pewarnaan aceto-orcein. Evaluasi MII sampel oosit diambil dari medium maturasi sesuai dengan periode maturasi 24 jam. Sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet dalam medium yang mengandung hyaluronidase 100 IU. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus difiksasi dalam asam asetat-metanol 1:3 selama 24 jam, diwarnai dengan aceto-orcein 1% selama 10 menit dan dibersihkan dengan aceto-glycerol. Pengamatan MII dilakukan dengan menggunakan *inverted microscope* (Boediono *et al.*, 1995). Oosit yang matang ditandai dengan terlihatnya metaphase plate. Perhitungan persentase maturasi oosit dilakukan dengan perbandingan oosit yang matur (MII) dengan jumlah oosit yang diwarnai pada satuan persen.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis analitik parametric. Analisis analitik parametric menggunakan Uji Multivarian ANOVA (*Analysis of Variance*) dilanjutkan dengan Uji ANOVA dan dilanjutkan lagi dengan Uji Duncan dengan taraf nyata 5% (Kusriningrum, 2011). Untuk memudahkan perhitungan statistik digunakan *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) 20.

4.9 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Bagan Kerangka Operasional