

## BAB 4 MATERI DAN METODE

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan asumsi populasi sama dan memiliki kriteria yang homogen serta karakteristik sama. Semua kelompok penelitian berasal dari satu populasi dan objek yang diteliti adalah oosit pada ovarium sapi yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH). Tahapan penelitian meliputi aspirasi oosit, maturasi oosit, pewarnaan dan pemeriksaan ekspresi *Bax* dan *Bcl-2* untuk melihat tingkat apoptosis oosit pada media maturasi *in vitro*. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan diusahakan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium.

### 4.2 Populasi, Sampel Penelitian, Besar Ulangan dan Teknik Pengambilan Sampel

#### 4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) dan dibawa ke sub laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga selanjutnya dilakukan aspirasi cairan folikel ovarium untuk mendapatkan oosit yang dipakai sebagai sampel penelitian.

#### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah oosit sapi yang belum matur (masih terdapat cumulus oosit kompleks) yang diperoleh dari hasil aspirasi folikel ovarium sapi.

#### 4.2.3 Besar Ulangan

Besar ulangan pada penelitian ini berdasarkan rumus Federer (1963) dalam Kusriningrum (2011):

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

- t = kelompok perlakuan
- n = jumlah ulangan

Banyaknya sampel dalam penelitian ini adalah :

$$\begin{aligned} t(n-1) &= 15 \\ 3(n-1) &= 15 \\ 3n &= 18 \\ n &= 6 \end{aligned}$$

Dengan rumus diatas, didapatkan jumlah ulangan 6 untuk 3 perlakuan, maka dibutuhkan minimal 6 kali (*batch*) maturasi untuk perlakuan.

#### 4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) yang kemudian dicuci dengan menggunakan PBS beberapa kali pencucian hingga cairan pencuci menjadi jernih, kemudian dilakukan aspirasi.

Oosit diambil dengan aspirasi menggunakan jarum 18G yang dihubungkan dengan spuit 10 ml dan berisi 1 ml media diseksi yang terdapat 10% FBS, kanamicyn 5 ml/L, sedangkan pengambilan sampel oosit berasal dari folikel yang mempunyai diameter permukaan 2 – 8 mm. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium diseksi.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas (*Independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *urea* yang ditambahkan pada medium maturasi dengan dosis 20 mg/dl, 40 mg/dl.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung (*Dependent variable*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu maturasi oosit, ekspresi *Bax*, *Bcl-2* dan *Bax/Bcl-2* untuk pemeriksaan apoptosis.

### 4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah ovarium sapi, medium maturasi (TCM-199), inkubator CO<sub>2</sub>, suhu, lama maturasi, metode pemeriksaan ekspresi *Bax*, *Bcl-2* dan *ratio Bax/Bcl-2*.

### 4.4 Definisi Operasional Variabel

- Urea dalam penelitian ini adalah urea (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) yang ditambahkan kedalam media maturasi *in vitro*.
- Ekspresi *Bax* dalam penelitian ini adalah adanya warna kecoklatan pada kumulus dan oosit yang diekspresikan setelah dilakukan uji imunositokimia dengan penambahan antibodi *Bax*.
- Ekspresi *Bcl-2* dalam penelitian ini adalah adanya warna kecoklatan pada kumulus dan oosit yang diekspresikan setelah dilakukan uji imunositokimia dengan penambahan antibodi *Bcl-2*.
- Rasio *Bax/Bcl-2* dalam penelitian ini adalah pembagian dari (mean ± SD) ekspresi *Bax* dengan ekspresi *Bcl-2*.
- Maturasi Oosit dalam penelitian ini adalah persentase kematangan oosit yang dilihat setelah pewarnaan aceto orcein yang ditunjukkan dengan adanya metaphase plate dan adanya polar body I.

### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.5.1 Bahan dan Alat Penelitian Maturasi *In Vitro*

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®, Steinheim, Germany) yang disimpan pada suhu 4–5°C serta mempunyai pH 7,2, mineral oil,

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma®, St. Louis USA), Fetal bovine serum (FBS), Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), Kanamycin sulfate (Bioplus), Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) (PG600®, Canada), urea (Sigma® U5378-100G), aquadest steril, Alkohol 70%, disposable petridish (Nuclon), NaCl fisiologis, hyaluronidase, pewarna aceto-orsein 1%, larutan fiksatif, Antibodi anti-*Bax*, Antibodi anti-*Bcl-2*, hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%, counter staining Methyl green, paraffin wax, vaseline, glycerine, perekat, object glass dan cover glass.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator CO<sub>2</sub> yang dilengkapi pengatur suhu dan kelembapan dan gas CO<sub>2</sub>, mikroskop dissecting (Olympus, SZ61), inverted microscope, laminar air flow (Panasonic), 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 µm), jarum 18G, mikro pipet (Eppendorf), petridish steril, slide staining jar.

#### **4.5.2 Bahan dan Alat Pemeriksaan Imunositokimia**

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan imunositokimia adalah *Poly-L Lysine* larutan fiksatif (*Methanol* dingin (-20°C) sebanyak 120 ml), PBS 10%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% , *Bax/Bcl-2 staining kit*, diluents-Ab 5%, antibodi sekunder biotinylated, streptavidin *fluorophore-conjugated*, pewarna *counter staining Mayer*, *aquades* steril.

Sedangkan alat yang digunakan untuk pemeriksaan imunositokimia adalah spuit disposable ukuran 10 ml ukuran jarum 22-23 G, panjang 30-50 mm, kapas alkohol, inkubator, staining jar, rak kaca objek, rak inkubasi, pensil diamond,

pipet mikro, kertas saring, stop watch, gelas erlenmeyer, gelas beker, tabung sentrifuge 15 ml, microwave, fortex, thermo stirrer, slide, deck glass dan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali.

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Koleksi oosit yang belum matang dari ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH), maturasi oosit *in vitro*, dan perhitungan persentase oosit yang matur dan fiksasi dilakukan di Laboratorium *In vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat Imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu Penelitian dilaksanakan pada bulan July sampai Oktober 2019.

#### **4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Perlakuan Ovarium**

Tahap pertama dalam proses *In Vitro Maturation* adalah memisahkan ovarium dari penggantungnya, kemudian tahap selanjutnya adalah melakukan pencucian ovarium menggunakan PBS sebanyak 3 kali. Langkah selanjutnya adalah melakukan aspirasi oosit dengan menggunakan jarum 18G dan syringe 10ml dari folikel yang berdiameter 2-8 mm untuk koleksi oosit dan dimasukkan ke dalam media diseksi. Kemudian ditunggu sampai 5 menit untuk mengendapkan oosit, setelah itu dilakukan pencucian dan pemilihan oosit pada media diseksi.

##### **4.7.2 Maturasi Oosit *In Vitro***

Untuk proses maturasi oosit digunakan medium TCM-199 yang ditambah PMSG 100 IU/ml, hCG 100 IU/ml, FBS 10%, sedangkan untuk kelompok

perlakuan urea yang digunakan untuk suplementasi dalam media maturasi adalah 20 mg/dl dan 40 mg/dl. Konsentrasi masing - masing urea ini setara dengan 9,3 mg/dl dan 18,7 mg/dl BUN (Kowsar *et al.*, 2018). Setiap *petridish* terdapat tiga drop media maturasi dan berisi 300  $\mu$ l/drop yang telah dilapisi *mineral oil* kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, kelembaban 95%, suhu 38,5°C (Kusindarta, 2009; Widjiati, 2011).

Pada tiap ulangan oosit yang diperoleh dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol (P0), kelompok perlakuan dengan penambahan urea 20 mg/dl (P1), dan kelompok perlakuan dengan penambahan urea 40 mg/dl (P2). Setiap kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 bagian masing-masing untuk identifikasi *Bax* dan *Bcl-2*.

#### **4.7.3 Identifikasi *Bax* dan *Bcl-2* dengan Pewarnaan Imunositokimia**

Oosit yang telah dimaturasi selama 20 jam diletakkan pada gelas objek dan dijepit, kemudian difiksasi ke dalam larutan fiksatif (methanol dingin (-20°C) sebanyak 120 ml), kemudian dicuci kembali dengan PBS dua kali selama 10 menit. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% ditetaskan dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan PBS. Diinkubasi dengan menambahkan antibodi anti *Bax/Bcl-2* yang diencerkan dengan diluents-Ab 5% selama 1 jam pada suhu ruang. Diinkubasi dengan antibodi sekunder biotinylated (diencerkan dalam PBS) pada suhu ruang. Kemudian dicuci 10 kali selama 60 menit dalam PBS. Diinkubasi dengan streptavidin *fluorophore-conjugated* yang diencerkan dalam PBS selama 2-3 jam pada suhu 37°C lalu dicuci 10 kali selama 60 menit dalam PBS. Oosit diwarnai dengan *counter staining Mayer* dan dibilas dengan *aquades* steril, kemudian dikeringkan dan dilihat dengan mikroskop dengan perbesaran 100 kali

dan 400 kali. Hasil yang positif akan terlihat warna kecoklatan (Hoffman *et al.*, 2008).

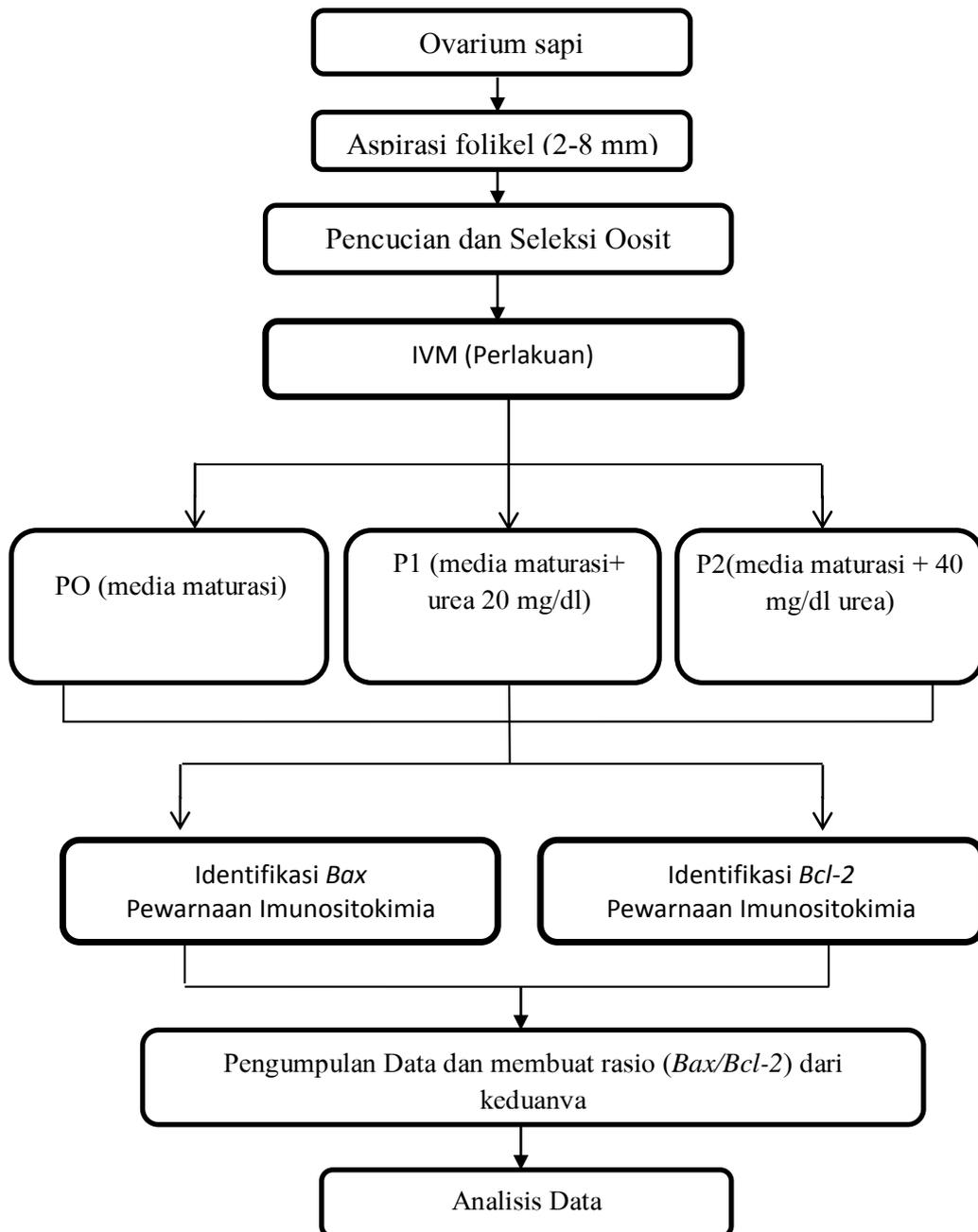
#### **4.7.4 Perhitungan Persentase Oosit Matur dengan Pewarnaan Aceto Orcein**

Perhitungan persentase oosit yang dimaturasi selama 20 jam dapat dilakukan dengan pewarnaan *aceto-orcein*. Evaluasi MII sampel oosit yang mempunyai diameter permukaan 2-8 mm diambil dari medium maturasi sesuai dengan periode maturasi. Sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan tip pipet dengan diameter yang sesuai dengan diameter oosit. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus difiksasi 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.*, 2003). Perhitungan persentase maturasi oosit (oosit mencapai stad. Metaphase II yang ditandai dengan adanya metaphase plate pada pewarnaan aceto orcein dan adanya polar bodi I), dilakukan dengan perbandingan oosit yang matur (MII) dengan jumlah oosit yang diwarnai dalam satuan persen (%).

#### **4.8 Analisis Data**

Data disusun dalam tabel kemudian dianalisis dengan sebaran data menggunakan shapiro-wilk. Data dalam penelitian ini tidak normal sehingga diuji dengan Uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan Mann-Whitney.

#### 4.9 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.1. Diagram Operasional Penelitian