

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari riset yang dilakukan oleh Hari Soepriandono tentang Optimalisasi Parthenogenesis oosit kambing dengan kombinasi stimulasi kenaikan kadar kalsium intraseluler, Pada oosit muda kalsium (Ca^{2+}) akan menyebar dan bergerak keluar masuk sel secara bebas dan berdasarkan fluoresensi kalsium pada oosit muda hasil pewarnaan dengan Fluo-3 kalsium berintensitas tinggi terdapat di zona pelusida. Sedangkan pada oosit dewasa kalsium (Ca^{2+}) akan berkumpul pada membran terluar pada zona pelusida dan akan membentuk lapisan di sebelah dalam membran vitelin, yang berfungsi sebagai lapisan pelindung agar sperma tidak dapat masuk sel.

Pada proses pertumbuhan dan pematangan oosit, terjadi osilasi kalsium (perubahan konsentrasi kalsium). Osilasi kalsium terjadi setiap 2-3 menit pada oosit imatur yang dihasilkan dari folikel antral (Carrol, 1994). Osilasi kalsium pada oosit biasanya diamati dengan metode imaging. Salah satu alat yang dapat mengidentifikasi terjadinya peristiwa osilasi kalsium adalah *laser fluorescence microscopy* yang memanfaatkan fenomena *Fluorescence Resonance Energy Transfer*.

Dimana *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) merupakan proses atau tehnik yang digunakan untuk mengamati interaksi antara dua molekul yang dilabeli dengan dua fluorophore yang berbeda (donor dan akseptor) di mana donor tereksitasi memberikan energinya ke akseptor terdekat tanpa radiasi (Berney, 2003). Dari prinsip tersebut, kalsium sebagai molekul donor dapat teramati dengan pemberian probe berupa Fluo-3 sebagai akseptor (Carrol, 1994).

Pada umumnya proses pengamatan FRET pada sel hidup banyak menggunakan mikroskop khusus yaitu *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)*. Prinsip dari mikroskop ini adalah fluoresensi yang dihasilkan dari reaksi antara spesimen yang diberi indikator dye atau fluorochrome dengan sumber eksitasi berenergi tinggi. Mikroskop ini menggunakan sumber eksitasi berupa sinar laser dan dapat dihubungkan dengan komputer sehingga mampu menghasilkan gambar 3 dimensi. Komponen dari mikroskop ini yaitu

laser sebagai sumber eksitasi berenergi tinggi, scanner sebagai pendeteksi daerah spesimen yang diteliti, filter sebagai penyaring emisi panjang gelombang hasil fluoresensi, detector sebagai pendeteksi hasil fluoresensi yang kemudian di olah oleh program menjadi pencitraan pada computer. Pada program CLSM ini terdapat panel intensitas laser , dimana besar –kecil intensitas input laser dapat diatur. Menurut riset pada pemakai CLSM, intensitas laser diatur secara acak tanpa mengetahui efek pada output FRET, hanya memfokuskan pada hasil pencitraan fluoresensi yang ditampilkan monitor.

Berdasarkan fakta di atas, maka dilakukan penelitian pengamatan fenomena Fluorescence Resonance Energy Transfer pada osilasi kalsium. Sampai saat ini pengamatan dengan menggunakan *laser fluorescence microscopy* hanya berkisar pada emisi dari Fluo-3 dengan pengaturan yang biasa tanpa adanya informasi yang lebih detail seperti pengaruh dari banyaknya intensitas laser yang masuk, dan pengamatan peristiwa transfer energi dalam proses fluoresensi secara non radiatif transfer dan jenis laser yang digunakan. Sehingga pada penelitian ini dilakukan perubahan prosentase laser sebagai sumber eksitasi yang diharapkan dapat memberikan informasi.

1.2 Rumusan Masalah

Perumusan masalah penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Bagaimana peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) pada eksperimen pengamatan Ca^{2+} dalam oosit kambing dengan indikator Fluo-3 ?
2. Bagaimana efek dari diubahnya prosentase laser - laser dari berbagai jenis laser yang digunakan untuk mengeksitasi Ca^{2+} terhadap emisi yang keluar dari eksperimen pengamatan Ca^{2+} dalam oosit kambing dengan indikator Fluo-3 ?

1.3 Batasan masalah

Batasan masalah penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Sampel yang digunakan untuk studi keberadaan calcium hanya pada oosit kambing (sel telur kambing).
2. Sample yang digunakan hanya diberi indikator Fluo-3.
3. Tidak menjelaskan tentang gerak kalsium yang keluar masuk sel, hanya menjelaskan kalsium yang berada dalam sel.

4. Perubahan prosentase dibuat dengan urutan maksimal, sedang, kecil dan referensi.

1.4 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Untuk mengidentifikasi terjadinya peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) pada eksperimen pengamatan Ca^{2+} dalam oosit kambing dengan indikator Fluo-3
2. Untuk mengidentifikasi perubahan yang terjadi dari dirubahnya prosentase laser yang digunakan untuk mengeksitasi Ca^{2+} terhadap emisi yang keluar dari eksperimen pengamatan Ca^{2+} dalam oosit kambing dengan indikator Fluo-3.

1.5 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terjadinya peristiwa Fluorescence Energy Transfer (FRET) pada eksperimen pengamatan kalsium di dalam Oosit immature kambing yang diberi indikator Fluo-3 dengan menggunakan CLSM, dan dapat memberikan informasi dari perubahan prosentase laser – laser yang digunakan sebagai eksitator dalam penelitian ini.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oosit atau sel telur

Oosit disebut juga sebagai sel kelamin betina yang belum matang. Dimulai dari bentuk oogonium melalui proses oositogenesis dan matang menjadi ovum atau sel telur dan ootid (melalui ootidogenesis) (Ismudiono, 2010).

Sel selalu mengandung kalsium. Konsentrasi kalsium dalam sel jauh lebih rendah dari konsentrasi kalsium di luar sel, karena ion kalsium secara aktif dikeluarkan dari sel dan secara aktif dikirim dari sitosol ke RE, akibatnya konsentrasi kalsium dalam RE lebih tinggi daripada di dalam sitosol (Campbell, 2004).



Gambar 2.1 Oosit pada kambing (Hasegawa dkk., 1994)

RE merupakan organel sel yang berfungsi untuk mensintesis protein dari lipid serta sebagai penyimpanan kalsium. RE memiliki pompa kalsium, penyimpanan kalsium dan saluran khusus untuk mengeluarkan kalsium (Fox, 2004).

Kemampuan oosit untuk meningkatkan konsentrasi kalsium didalam sitoplasmanya tergantung pada perubahan biokimia dan struktural yang terjadi selama proses maturasi oosit. Sensitivitas sistem pengeluaran kalsium tergantung kepada kemampuan RE (kline, 1994). Selama proses maturasi oosit, struktur RE akan berubah. Perubahan ini berhubungan dengan kemampuan RE untuk melepaskan ion kalsium dari tempat penyimpanan (kline, 1994).

Kalsium dilepaskan dari RE ketika fertilisasi, karena saat fertilisasi terjadi perubahan struktur RE. Sehingga membran RE akan terfragmentasi (kline dkk., 1999). Bertemunya sel sperma dengan sel telur hingga menyatu memicu terjadinya transduksi sinyal yang menyebabkan retikulum endoplasma (RE) sel telur itu membebaskan kalsium (Ca^{2+}) ke dalam sitosol. Pembebasan kalsium dari RE dimulai pada tempat masuknya sperma dan kemudian menjalar dalam bentuk gelombang di seluruh sel telur yang dibuahi (Campbell, 2004).

Reaksi tersebut mengakibatkan saluran kalsium membuka dan membentuk gerbang ligand pada membran RE. Ca^{2+} yang keluar memicu pembukaan saluran lain. Dalam hitungan detik, konsentrasi Ca^{2+} yang tinggi menghasilkan perubahan dalam vesikula yang disebut granula kortikal, yang terletak persis di bawah membran plasma sel telur. Merspons terhadap peningkatan Ca^{2+} , granula kortikal menyatu dengan membran plasma dan membebaskan isinya ke dalam ruangan perivitelin antara membran plasma dan lapisan vitelin. Enzim – enzim dari granula itu memisahkan lapisan vitelin dari membran plasma sementara mukopolisakarida menghasilkan gradien osmotik, yang menarik air ke dalam ruang perivitein dan membengkakkan ruang tersebut. Sehingga mendorong lapisan vitelin menjauhi membran plasma, dan enzim lain mengeraskan lapisan tersebut. Lapisan vitelin menjadi membran fertilisasi yang menahan masuknya sperma lainnya. Lapisan vitelin disebut juga zona pelusida pada oosit mamalia (Blakely, 1991).

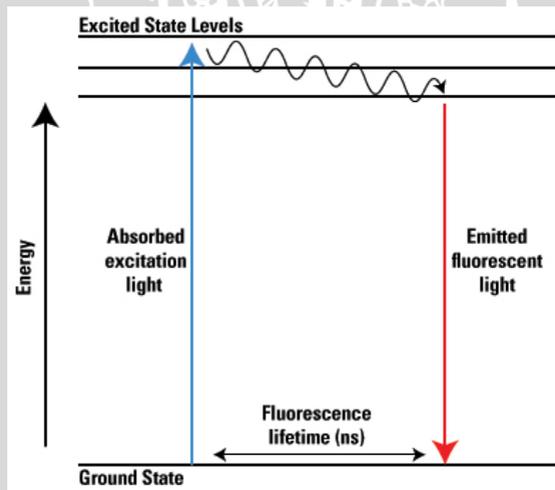
Gambar 2.1 merupakan gambar dari oosit mamalia immature dan mature. Untuk melindungi oosit, oosit memiliki beberapa lapisan pelindung, salah satu nya adalah zona pelusida. Zona pelusida disintesis dan disekresi oleh oosit (Hasegawa dkk., 1994). Zona pelusida menyerupai gel yang tersusun atas protein dan polisakarida dan terletak di antara oosit dan korona radiata (Fox, 2004). Zona pelusida berperan dalam proses pengenalan gamet (gamete recognition), aktivasi sperma, dan pencegahan terhadap proses polispermia.

2.2 Fluoresensi

Fluoresensi merupakan peristiwa pemendaran cahaya karena adanya rangsangan atau stimulus. Stimulus dapat berupa cahaya atau

sinar yang berenergi tinggi. Gejala fluoresensi ini terjadi ketika suatu materi mengalami radiasi cahaya dan kemudian melepaskan kembali radiasi tersebut dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Karena peristiwa fluoresensi hanya dapat terjadi ketika ada rangsangan, maka fluoresensi ini hanya akan berlangsung selama rangsangan tersebut di berikan, lamanya fluoresensi berlangsung yaitu sekitar 10^{-8} detik (Iakowicz, 2006)

Molekul *fluorescent* atau disebut juga fluophores atau fluors, lebih sensitif terhadap cahaya. Dilihat dari Gambar 2.2, sebuah foton dari cahaya eksitasi di serap oleh sebuah elektron dari partikel fluorescent, yang mana meningkatkan level energi elektron ke dalam keadaan eksitasi. Selama masa eksitasi yang singkat ini, beberapa energi didisipasikan atau dihamburkan oleh tabrakan molekul atau dikirimkan kepada molekul proksimal, dan kemudian sisa energi diemisikan sebagai foton untuk membuat elektron kembali dalam keadaan dasar (Mason, 1999).

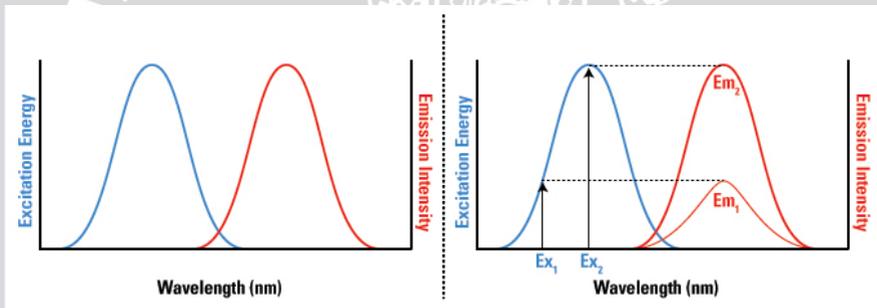


Gambar 2.2 Diagram energi fluoresensi Jablonski (Iakowicz, 2006)

Karena foton yang diemisikan biasanya membawa energi yang lebih sedikit (sehingga memiliki panjang gelombang yang lebih besar daripada foton eksitasi), maka *fluorescent* teremis dapat dibedakan dari cahaya eksitasi. Eksitasi dan emisi foton dalam

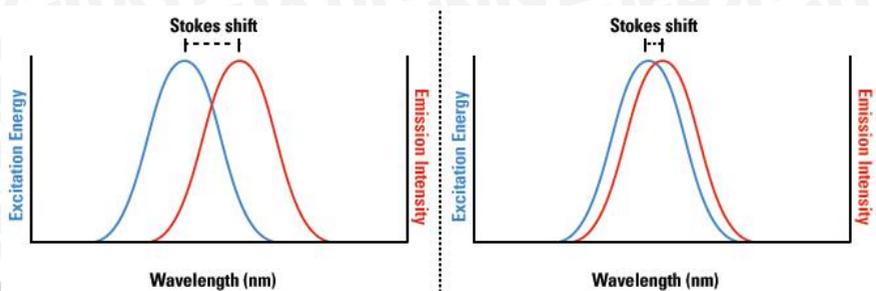
fluorophores membentuk siklus, dan sampai fluorophore rusak total, hal ini dapat dieksitasi berulang – ulang .

Kedua panjang gelombang dari eksitasi dan emisi karakteristiknya spesifik untuk setiap fluorophore. Spektrum untuk molekul floresen (baik mono maupun poliatomik) digambarkan pada plot x,y yang mengindikasikan panjang gelombang yang sesuai terhadap intensitas sinyal maksimum dan minimum dari eksitasi dan emisi untuk setiap fluorophor, seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 2.3. Panjang gelombang emisi tidak bergantung pada panjang gelombang eksitasi dikarenakan hilangnya sebagian energi sebelum emisi, intensitas emisi proporsional terhadap amplitudo panjang gelombang eksitasi seperti yang diindikasikan oleh energi eksitasi (Ex_1 dan Ex_2) dan intensitas emisi mereka yang berkaitan (Em_1 dan Em_2) dalam Gambar 2.3 (Gordon, 1998; Hussain, 2008).



Gambar 2.3 Spektrum eksitasi dan emisi dari sebuah fluorophor dan hubungan antara amplitudo eksitasi dan intensitas emisi (Hussain, 2008).

Jarak antara panjang gelombang eksitasi dan emisi disebut dengan pergeseran stoke atau *stokes shift*, seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 2.4 . Sebagai contoh, deteksi floresen teremisi sulit untuk dibedakan dari cahaya eksitasi ketika menggunakan fluoropor dengan pergeseran stoke yang kecil, karena panjang gelombang eksitasi dan emisi sangat tumpang tindih.



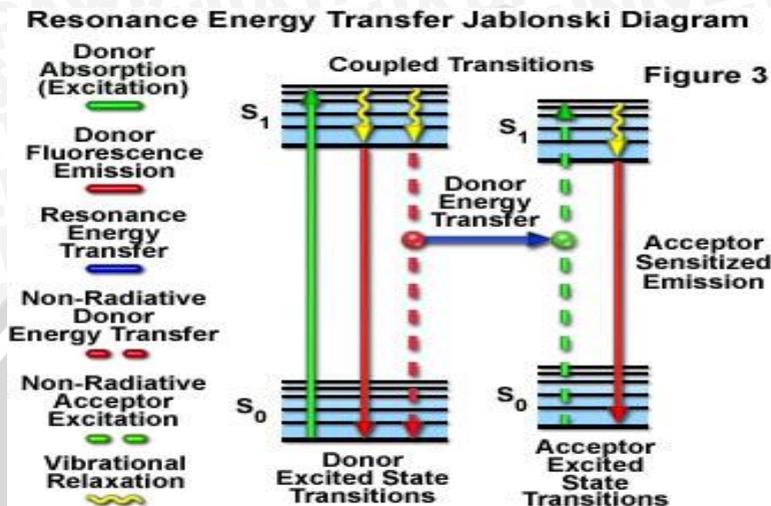
Gambar 2.4 Pergeseran stoke dari spectrum eksitasi dan emisi fluoropor (Hussain, 2008)

Pergeseran stoke sangat penting dalam aplikasi floresen berlapis, karena panjang gelombang emisi dari salah satu fluor dapat tumpang tindih, dan karena itu mengeksitasi fluor lain dalam sampel yang sama.

2.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

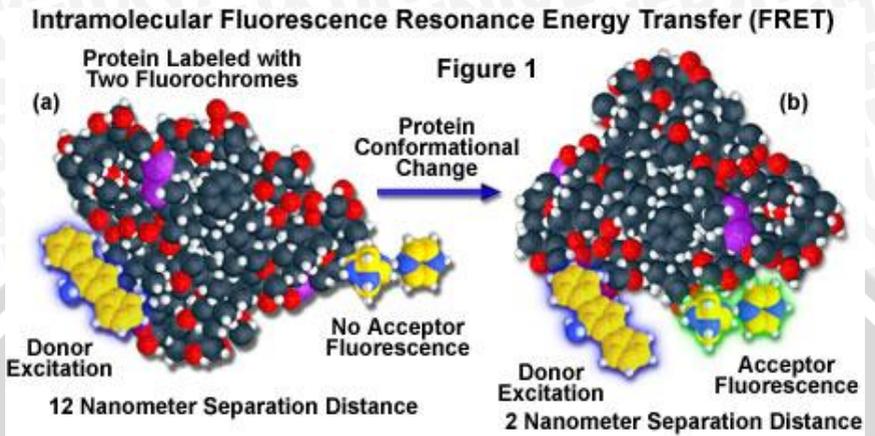
Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) adalah suatu proses interaksi antara kedua fluorochrome yang disertai dengan transfer energi langsung dari donor ke akseptor pada jarak tertentu (1nm – 10 nm). Selain mempunyai jarak tertentu peristiwa FRET juga dapat terjadi apabila ada akseptor, serta panjang gelombang emisi yang dihasilkan oleh akseptor selalu lebih besar dan energinya selalu lebih kecil dari pada donor.

Mekanisme terjadinya FRET dijelaskan melalui diagram Jablonski transfer energi secara resonansi diilustrasikan melalui Gambar 2.5. Terdapat donor dan acceptor, ketika acceptor dipapar sejumlah energi dari suatu sumber energi tinggi. Molekul donor akan menyerap energi yang besar tersebut sehingga mengakibatkan molekul berenergi tinggi pada lintasan (S_0) tereksitasi ke lintasan dengan tingkat energi yang lebih tinggi (S_1). Pergerakan ini diikuti dengan relaksasi getaran atau *Vibrational Relaxation*, dimana molekul ini mengalami transisi dari elektron tingkat energi atas ke tingkat energi lebih rendah, (deeksitasi) tanpa adanya radiasi. Emisi dapat terjadi biasanya 10^{-8} detik setelah eksitasi, ketika elektron kembali ke keadaan dasar yang lebih stabil S_0 , akan memancarkan cahaya yang memiliki panjang gelombang yang lebih besar dari panjang gelombang eksitasi (Fellers, 2007).



Gambar 2.5 Diagram Jablonski Transfer Energi secara resonansi (Fellers, 2007).

Salah satu contoh terjadi dan tidak terjadinya FRET dilihat dari jaraknya dapat diilustrasikan pada Gambar 2.6. Pada Gambar 2.6 (a) tidak ada interaksi antara donor dan akseptor, dimana ketika diberi energi donor akan tereksitasi dan ketika donor mengalami deeksitasi, maka akan terjadi transfer energi ke akseptor, namun dalam hal ini karena akseptor berada pada jarak yang cukup jauh maka akseptor tersebut tidak dapat menerima energi yang di transfer oleh donor sehingga tidak terjadi peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Sedangkan pada Gambar 2.6 (b), terlihat adanya interaksi antara donor dan akseptor, dimana ketika donor tereksitasi dan pada waktu tertentu donor akan terdeeksitasi, sehingga akan memancarkan energi yang akan diterima oleh akseptor. Namun karena akseptor berada pada jarak yang cukup dekat yaitu 2 nm, maka energi yang dipancarkan oleh donor ditangkap atau diterima oleh akseptor sehingga akseptor tersebut bersifat autofluorescence yang artinya terjadi peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

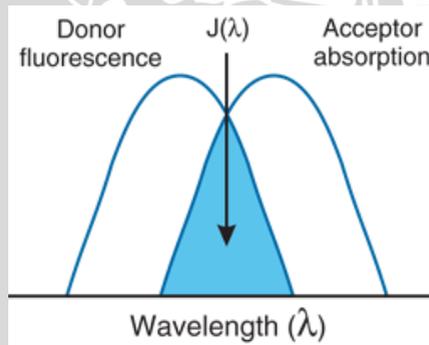


Gambar 2.6 Peristiwa FRET dan Bukan FRET (Dos Remindos, 1987)

2.3.1 Metode pengukuran FRET

Syarat FRET ;

- Donor dan akseptor molekul harus dalam jarak terdekat (biasanya 10-100 Å).
- Spektrum penyerapan akseptor harus tumpang tindih spektrum emisi fluoresensi dari donor (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Skema representasi dari fret tumpang tindih spektral (Brochan, 2001).

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) dapat diukur dengan beberapa cara, seperti metode ratiometrik FRET dan metode FLIM-FRET. Kedua metode ini mengukur efisiensi FRET, yaitu efisiensi dimana fluorophore donor menstansfer energi non-radiatively ke fluorophore akseptor. Efisiensi FRET (E), dan jarak antara molekul donor dan akseptor (r) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + I^2) \quad (2.1)$$

$$E = 1 - (I_{DA} / I_D) \quad (2.2)$$

$$t = R_0 \{ (1/E) - 1 \}^{10} \quad (2.3)$$

Dimana R_0 adalah jarak kritis Forster, T (D), yaitu jarak yang memisahkan donor dan akseptor, dimana jarak tersebut memiliki efisiensi transfer energi sebanyak 50% (Brochan, 2001).

2.4 Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) merupakan alat yang digunakan untuk melihat sampel yang bekerja dengan metode fluoresensi dan menggunakan teknik filtrasi spasial (Spacial Filtering Technique) serta preparasi sampel tidak membutuhkan waktu yang lama. Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ini memiliki 4 channel, dengan resolusi yang besar (sampai 4096 x 4096 pixel). Hasil dari microscope akan di masukkan kedalam komputer yang khusus beroperasi dengan CLSM seperti yang terlihat pada Gambar 2.8. Pada dasarnya sampel yang diamati dengan menggunakan CLSM diberikan zat pewarna atau indikator sesuai dengan apa yang akan di amati, maka sampel dapat terlihat berpendar. Akan tetapi tidak semua sampel berpendar jika tidak diberi stimulus atau zat pewarna (Fellers, 2007).



Gambar 2.8 Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (olympus, 2012)

2.4.1 Spesifikasi olympus fluoview FV 1000 confocal laser scanning microscope (CLSM)

Spesifikasi dari Confocal Laser Scanning Microscope ini adalah :

1) Laser

Mikroskop khusus ini berbeda dengan mikroskop pada umumnya, karena mikroskop ini dapat melihat sel hidup dalam bentuk 3D dengan tampilan warna – warna yang dihasilkan oleh fluoresensi akibat dari reaksi antara fluorochrome dengan zat tertentu dalam sample. Sehingga diperlukan sumber eksitasi yang memiliki energi tinggi. Pada mikroskop ini digunakan beberapa macam laser.

Macam - macam laser yang digunakan pada CLSM ini (olympus, 2012) ;

- Laser multi Argon. Laser ini adalah salah satu dari laser ion yang menggunakan gas mulia. Laser ini dapat memancarkan sinar dengan panjang gelombang (458 – 488 – 515 nm).
- Laser Hene G. Laser ini termasuk laser gas yang bekerja secara kontinu dan beroperasi pada daerah hijau dengan spektrum 559 nm.
- Laser Hene R. Laser ini merupakan laser gas dengan memancarkan sinar merah dengan spektrum 635 nm.

2) Scanner dan Detektor

3) Mikroskop dengan unit pencahayaan fluoresensi

4) Sistem pengendalian

- PC
- Power Supply Unit
- Monitor

5) Satuan opsional

Ada 4 macam satuan opsional pada CLSM ini yaitu ;

- SIM scanner
- TIRFM Unit
- 4 channel detektor
- Port untuk fluoresensi

2.5 Indikator Fluorescence

Indikator kalsium yang banyak digunakan adalah probe fluorescense kimiawi, karena pada umumnya sinyal mereka lebih besar untuk perubahan yang diberikan dalam $[Ca^{2+}]$ di bandingkan dengan indikator Ca^{2+} lain. Ada beberapa indikator kalsium fluorescense yang berbeda dan ini penting untuk memilih probe yang cocok untuk eksperimen yang digunakan. Indikator dapat dibagi menjadi beberapa grup berdasarkan kriteria yang berbeda salah satunya dengan memisahkan mereka berdasarkan dengan indikator *rasiometric* (Indo-1 dan Fura -2) dan indikator *non rasiometric* (Fluo-3, Calcium green dan rhod-2). Pembagian yang tak kalah penting adalah spektra eksitasi atau emisi. Spektra absorpsi contohnya UV atau Visible-wavelength dari indikator harus diperiksa dan dbandingkan secara optimal kedalam output maksimal dari sumber cahaya eksitasi. Indikator kalsium cahaya tampak memiliki kelebihan dibandingkan indikator kalsium UV, yaitu : 1) emisinya berada dalam area spektrum elektromagnetik dimana cellular autofluorescense dan hamburannya tidak separah UV; 2) tingkat kandungan bahan berbahaya cahaya tampak tidak sebanyak dari UV; 3) eksitasi dengan cahaya tampak memungkinkan pengawasan perubahan $[Ca^{2+}]$ sambil memanipulasi perubahan yang di teliti menggunakan bahan yang sensitif terhadap UV (Takashi, 1999).

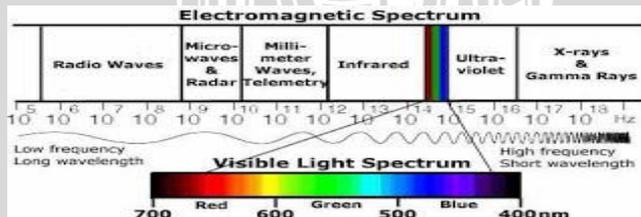
2.6. 1 Fluo-3

Fluo-3 adalah salah satu indicator Ca^{2+} yang paling banyak digunakan pada mikroskop yang bekerja dengan metode fluoresensi

Puncak panjang gelombang tertinggi absorpsi dan emisi Fluo-3 masing- masing sebesar 506 dan 526 nm. Fluoresensi dari reaksi indicator Fluo-3 dengan laser Argon (488 nm) sebagai eksitator menghasilkan puncak panjang gelombang tinggi (>500 nm) dan diikuti dengan naiknya $[Ca^{2+}]$. Fluo-3 dapat mengalami peningkatan fluoresensi 40 – 200 kali lipat setelah mengikat kalsium. Karena rentang peningkatan kalsium setelah mengalami stimulasi pada umumnya 5 – 10 kali lipat, maka Fluo-3 merupakan probe yang baik untuk digunakan dengan sensitivitas yang tinggi. Kelemahan dari Fluo-3 adalah jika hanya menggunakan Fluo-3, tidak mungkin untuk melakukan pengukuran ratiometric terhadap $[Ca^{2+}]$ karena Fluo-3 tidak menampilkan pergeseran spektrum absorpsi maupun emisi setelah mengikat Ca^{2+} (technologies, 2012).

2.7 Rentang warna

Spektrum elektromagnetik adalah rentang luas dari semua panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik, dan spektrum cahaya tampak terbatas pada sebagian kecil panjang gelombang, seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 2.9. Awalnya aplikasi riset berbasis fluoresen yang menggunakan fluorophor yang hanya diemisikan dalam rentang tampak dari spectrum elektromagnetik (390-700 nm) karena batasan dalam pendeteksian berada di bawah cahaya tampak. Perkembangan teknologi sekarang memungkinkan pendekteksian fluorophor di bawah batas spectrum cahaya tampak dan ke dalam rentang ultraviolet dan infrared dari spectrum elektromagnetik. Fluorophor dan pendeteksi baru ini menawarkan variabilitas, fleksibilitas, dan kemampuan pelapisan yang lebih besar untuk aplikasi yang baru maupun yang dikembangkan (Brochan, 2001).



Gambar 2.9 Spektrum cahaya tampak yang mengindikasikan perkiraan panjang gelombang(Hadi, 2008)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB III

METODOLOGI

3.1 Rancangan Penelitian

Pengamatan osilasi kalsium pada sel hidup banyak dilakukan dengan menggunakan bantuan alat confocal laser scanning microscope yang bekerja dengan metode fluorescence yang dalam hal ini mengkaji energy transfer. Sel hidup dapat berfluoresensi jika ada probes dan stimulus. Pada microscope ini stimulus berupa laser. Karena laser memiliki peranan penting pada penelitian ini diperlukan studi yang lebih lanjut tentang bagaimana pengaruh dirubahnya prosentase laser – laser dari beberapa jenis laser pada program CLSM ini. Pola rancangan penelitian dapat dijelaskan pada Gambar 3.1.

3.2 Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini meliputi pembuktian terjadinya peristiwa Fluorescence Resonansy Energy Transfer (FRET) yang terjadi pada oosit yang telah di beri probe Fluo-3 dan diamati menggunakan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) dan mengamati efek dari perubahan prosentase laser – laser dengan panjang gelombang yang berbeda – beda terhadap intensitas output dari eksperimen ini. Pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan Agustus sampai bulan Maret.

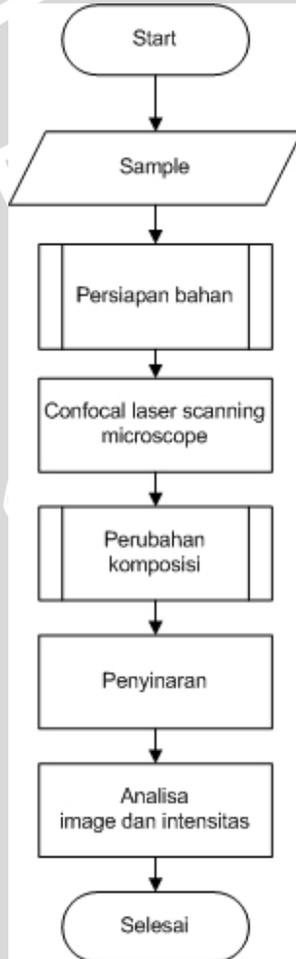
3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Filter Version Scan Unit Olympus IX81 dengan perangkat komputer, dan laser Argon 488 nm, Laser HeNe Green 543 nm, Laser HeNe Red 633 nm.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit muda yang diambil dari kambing potong yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH), calcium indicator yang berupa Fluo-3.



Gambar 3.1 Alur rancangan penelitian

3.3 Metode Penelitian

Sesuai dengan alur rancangan penelitian pada Gambar 3.1, maka setiap proses dapat dijelaskan sebagai berikut:

3.3.1 Prosedur Persiapan Bahan

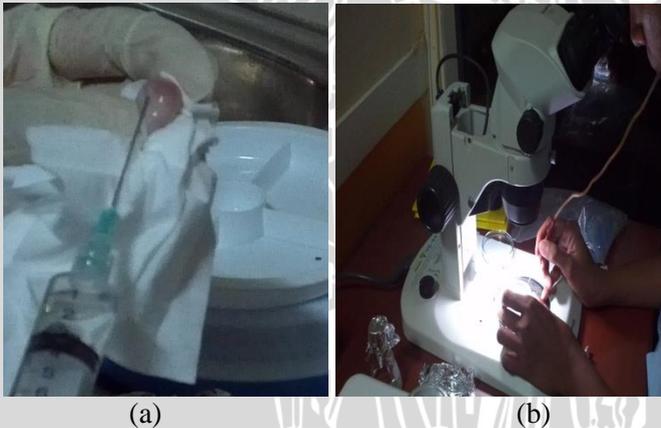
Persiapan bahan dimulai dengan ovarium kambing betina yang diambil dari rumah potong hewan (RPH) Sukun Malang. Ukuran ovarium kambing sebesar 1 ruas ibu jari orang dewasa, berwarna putih kekuningan dan tampak terlihat banyak pembuluh darah yang mengelilingi. Ovarium kambing yang didapat dari RPH masih dalam keadaan kotor dan ada sisa – sisa jaringan sistem reproduksi yang dapat mengotori ovarium. Setelah ovarium kambing dibersihkan dari jaringan sistem reproduksi lainnya yang menempel, ovarium dimasukkan ke dalam wadah atau toples yang berisi cairan NaCl steril dan antibiotik (ditunjukkan pada Gambar 3.2 (a)).



Gambar 3.2 Ovarium kambing yang masih menempel dengan saluran reproduksi (a). Ovarium kambing dengan larutan NaCl antibiotik (b). Waterbath yang dengan suhu 38°C (c).

Untuk menghindari kotoran dan kontaminan masuk, wadah tersebut ditutup rapat dengan menggunakan aluminium foil selain itu aluminium foil juga dapat mencegah perubahan suhu ovarium dalam toples. Sesuai dengan latar belakang penelitian, bahan yang digunakan merupakan sel hidup. Karena ovarium sudah dipisahkan dari sisa – sisa jaringan sistem reproduksi, maka ovarium membutuhkan media lain agar kondisi ovarium mendekati in vivo (

seperti berada didalam tubuh kambing). Pada penelitian ini digunakan termos atau waterbath yang diberi air hangat bersuhu sama dengan tubuh kambing (ditunjukkan pada Gambar 3.2 (b)). Proses selanjutnya ovarium diambil dengan menggunakan pinset steril agar ovarium dan NaCl tetap steril. Oosit dikoleksi dengan menggunakan disposable syringe 5ml dan jarum suntik ukuran 21 G. Ovarium ditusuk dibagian tepi dengan menggunakan syringe yang sudah berisi cairan pencuci 5 ml dengan syarat menghindari menusuk ovarium hingga tembus karena jika tembus maka cairan dalam ovarium akan ikut terbawa keluar sehingga oosit dalam ovarium tidak dapat diambil dan tidak boleh menusuk bagian folikel de graaf yang berbentuk benjolan besar berwarna merah, karena cairan didalamnya dapat mengganggu oosit, apabila oosit terkena cairan dari folikel tersebut maka oosit akan menggumpal atau kental sehingga oosit tidak bisa diambil(ditunjukkan pada Gambar 3.3 (a)). Karena tidak selalu pada 1 ovarium didapatkan oosit yang baik maka diperlukan kurang lebih 10 ovarium untuk dilakukan aspirasi.



Gambar 3.3 Aspirasi oosit kambing dengan cara menyuntik menggunakan jarum khusus (a). Pemilihan oosit menggunakan mikroskop inverted (b).

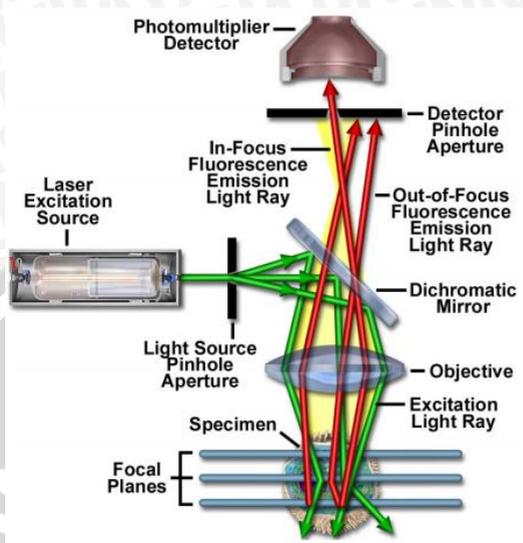
Selanjutnya oosit yang didapatkan dipindahkan kedalam cawan petri berisi larutan PBS untuk membersihkan oosit dari kotoran berupa jaringan lain. Karena oosit tidak semuanya dalam kondisi baik maka diperlukan seleksi oosit. Seleksi oosit dilakukan di bawah

mikroskop *inverted* dengan memindahkannya menggunakan pipet pasteur atau mikrohematokrit (ditunjukkan pada Gambar 3.3 (b)). Oosit yang dipilih yaitu yang memiliki sitoplasma kompak dan tidak pucat. Oosit yang akan diamati menggunakan CLSM dipilih oosit yang gundul agar sel kumulus tidak mengganggu pengamatan pada zona pelusida. Proses penggundulan oosit umumnya dilakukan dengan cara pipeting, yaitu menyedot oosit menggunakan pipet dan kemudian mengeluarkannya kembali. Oosit yang terpilih dipindahkan ke dalam cawan petri lain yang diberi PBS. Kemudian oosit tersebut ditetesi probes Fluo-3 dalam keadaan gelap. Proses ini membutuhkan waktu untuk penyerapan Fluo-3 oleh oosit. Oosit dengan Fluo-3 dipindahkan ke preparat dan diberi larutan PBS. Sehingga dapat diamati dengan menggunakan microscope.

3.3.2 Prosedur Pengamatan & Pengambilan Data

3.3.2.1 Prinsip Kerja CLSM

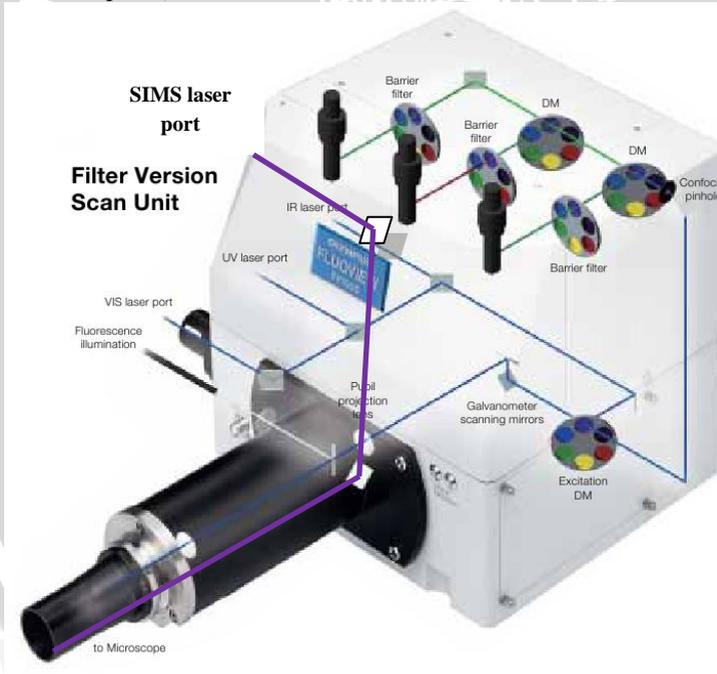
Secara umum prinsip dari confocal microscope dijelaskan pada Gambar 3.4. Cahaya koheren yang dipancarkan oleh sistem laser melewati celah *pinhole*. Terlihat pada Gambar terdapat 2 celah *pinhole*, yang pertama terletak di depan sumber laser dengan fokus pemindaian pada spesimen dan celah *pinhole* lainnya terletak di depan detektor (photomultiplier). Cahaya koheren yang melewati *pinhole* sumber eksitasi mengenai cermin dikromatik, sehingga mengakibatkan cahaya eksitasi tersebut terpantul secara menyebar. Cahaya eksitasi (warna hijau) hasil pantulan terfokus kembali ke spesimen melalui lensa obyektif dan masuk ke spesimen. Setelah cahaya eksitasi masuk ke dalam spesimen, spesimen tersebut memancarkan warna atau berfluoresensi yang kemudian disebut emisi cahaya *fluorescence* yang pada Gambar berwarna merah. Emisi fluoresensi ini memancar menembus lensa obyektif dan cermin dikromatik, lalu melewati celah detektor *pinhole* dan masuk ke dalam photomultiplier detektor. Emisi fluoresensi yang terjadi di atas dan di bawah lensa obyektif tidak menyatu atau tidak terfokus pada *pinhole* detektor. Akibatnya hanya sedikit emisi fluoresensi yang terdeteksi oleh detektor photomultiplier dan sebagian besar emisi fluoresensi tidak terdeteksi sehingga tidak dapat berkontribusi pada Gambar yang dihasilkan (Stelzer, 2000).



Gambar 3.4 Diagram jalur optik dan komponen utama dalam laser mikroskop confocal (Nathan S. Claxton).

Penelitian ini menggunakan confocal laser scanning microscope untuk melihat terjadinya transfer energi pada sel hidup. Secara umum mikroskop ini menggunakan laser sebagai sumber energi, karena laser bersifat koheren, maka dengan menggunakan laser yang berfokus sempit, maka diperlukan scanning untuk memperluas daerah yang akan diimaging. Pada mikroskop konfokal ini terdapat beberapa sumber laser dioda sebagai sumber untuk eksitasi, *scan head* dengan komponen optik dan elektronik, detektor elektronik (photomultiplier), dan seperangkat komputer untuk akuisisi, pengolahan, analisis, dan menampilkan Gambar. *Scan head* merupakan bagian yang paling penting dari sistem confocal dan bertanggung jawab untuk rasterisasi scan eksitasi (menyatukan hasil pemindaian eksitasi), serta mengumpulkan sinyal foton dari spesimen yang diperlukan untuk menyusun Gambar akhir. *Scan head* biasanya terdiri dari sumber eksternal laser, filter fluoresensi, cermin berkekuatan tinggi dengan lapisan baru yang special dan cermin dikromatik, sistem cermin pemindai raster berbasis galvanometer, celah pinhole untuk menghasilkan Gambar confocal, dan detektor

exitation DM, cahaya eksitasi dipantulkan oleh cermin dikromatik dan mengenai celah confocal *pinhole*. Sesuai dengan teori yang telah dijelaskan sebelumnya, cahaya hasil pantulan dari cermin dikromatik membuat cahaya eksitasi tidak menyatu atau menyebar kesegala arah akibatnya hanya sedikit cahaya yang masuk ke dalam celah confocal *pinhole*. Pada Gambar 3.6 Cahaya yang melalui celah pinhole diteruskan ke *exitation DM (Dicromatic Mirror)* . Cahaya eksitasi terpecah menjadi 2, ada yang diteruskan ke *exitation DM* dan ada yang masuk ke dalam detektor 1 (*photomultiplier*) melalui filter. Cahaya eksitasi yang masuk diteruskan ke *exitation DM* terbagi menjadi 2 bagian, ada yang dibelokkan tersaring filter kemudian masuk ke detektor 2 (*photomultiplier*) dan yang diteruskan menumbuk cermin dikromatik yang mengakibatkan cahaya eksitasi masuk ke dalam filter dan terdeteksi oleh detektor 3(*photomultiplier*).



Gambar 3.6 Olympus Filter Version Scan Unit (olympus, 2012)

3.3.3 Pengaturan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah CLSM yang terdiri dari ; mikroskop dengan unit pencahayaan fluoresensi, Sistem pengendalian PC, Power Supply Unit dan Monitor.

3.3.3.1 Proses Pengambilan Data dan hasil

A. Pemilihan filter

Sebelum pengambilan data diperlukan pengaturan alat dan program. Pertama membuka penutup mikroskop. Menyalakan laser yang digunakan, pada penelitian ini digunakan laser ion argon dan laser dioda. Kemudian menyalakan unit scan dan mikroskop. Dan komputer otomatis akan menyala. Setelah itu membuka program Olympus FV10-ASW 1.7 karena hasil imaging pada mikroskop akan ditampilkan pada program olympus ini. Sehingga disini hanya dijelaskan proses pengambilan data secara umum yang sesuai dengan perlakuan pada saat pengambilan data.

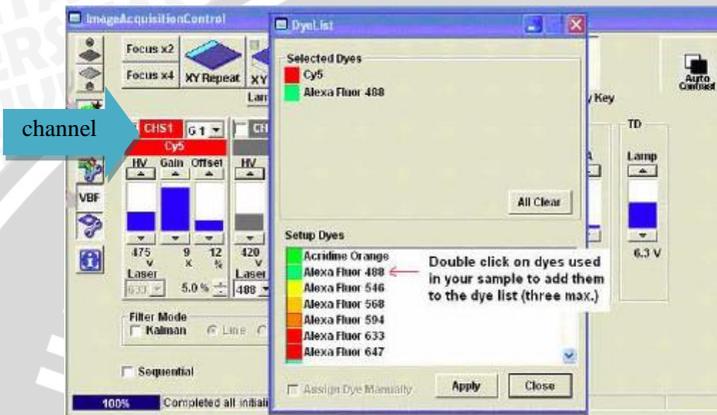
Pengaturan pemilihan panjang gelombang emisi pada filter dapat dilakukan dengan cara menekan tombol dye list pada bagian kiri dari jendela *image acquisition control*. Kemudian akan muncul jendela Dye List (terlihat pada Gambar 3.7), dengan menekan 2 kali pada nama dye yang tercantum pada jendela tersebut, maka dye list akan tertampil pada *selected dyes*. Karena hanya terdapat 3 channel pada program ini maka hanya dibutuhkan 3 dye saja. Pemilihan dye ini tidak secara acak karena channel ini bertugas sebagai penangkap fluoresensi yang dihasilkan pada saat terjadinya fret. Sehingga ketika memilih dye harus dipertimbangkan kecocokan rentang panjang gelombang dan warna setiap pasangan dye. Setelah pemilihan dye selesai, kemudian untuk mengaplikasikan pada penelitian ini maka dapat ditekan tombol apply. Dye list akan sendirinya masuk pada kolom channel yang terlihat seperti pada Gambar.

Filter berfungsi untuk menyeleksi panjang gelombang (λ) yang masuk agar sesuai dengan titik puncak (λ) dari dye, filter yang digunakan pada penelitian ini :

1. Filter Calcium Green2 (536 nm).
2. Filter Cy 3,5 (594 nm).
3. Filter Cy 5 (666 nm).

Biasanya penelitian yang menggunakan Fluo-3 sebagai indikator, juga menggunakan setting filter Fluo-3. Akan tetapi pada

penelitian ini dipilih filter calcium green2, Cy 3,5, dan Cy 5 dengan pertimbangan range panjang gelombang dari filter tersebut lebih lebar dari pada filter Fluo-3 sehingga dengan harapan dapat menambah jumlah transfer energi yang lebih banyak.



Gambar 3.7 Panel Dye List pada program olympus

B. Prosedur Perubahan Komposisi

Sesuai dengan penelitian ini yang mengkaji pengaruh perubahan prosentase laser - laser dari beberapa jenis laser yang digunakan untuk mengeksitasi Ca^{2+} terhadap emisi yang keluar dari eksperimen pengamatan Ca^{2+} dalam oosit kambing dengan indikator Fluo-3, untuk merubah prosentase dapat dilakukan dengan memilih jendela acquisition setting pada program Olympus FV10-ASW 1.7 (terlihat pada Gambar 3.8).

Pada panel prosentase laser terdapat 5 macam laser yaitu panjang gelombang 458 nm dengan warna biru, 488nm dengan warna biru muda, 515 nm warna torquise, 543 nm warna hijau , dan 633 nm dengan warna merah. Pada penelitian ini digunakan 3 laser yaitu 488nm, 543nm, dan 633nm dengan prosentase – prosentase yang ditunjukkan pada tabel 1. Perubahan prosentase dapat dilakukan dengan menekan tombol panah kanan untuk menambah prosentase dan panah kiri untuk mengurangi prosentase. Setelah prosentase ditentukan panel laser dicentang. Hal ini dilakukan untuk menandai bahwa laser itu digunakan pada penelitian dengan prosentase yang telah ditentukan. Sedangkan untuk tidak

menggunakan laser prosentase di letakkan pada prosentase 0% dan panel laser tidak dicentang.

Tabel 1. Tabel Percobaan

Percobaan	Persentase Laser (%)		
	488 nm	543 nm	633 nm
1	60	0	0
2	60	10	0
3	50	50	0
4	50	35	15
5	50	15	35
6	40	8	8
7	10	60	0
8	0	60	0
9	0	60	10
10	0	50	50
11	15	50	35
12	35	50	15
13	8	40	8
14	0	10	60
15	0	0	60
16	10	0	60
17	50	0	50
18	15	35	50
19	35	15	50
20	8	8	40
21	60	0	10

Keterangan :

Konsep prosentase :

1 sumber laser 60 % 

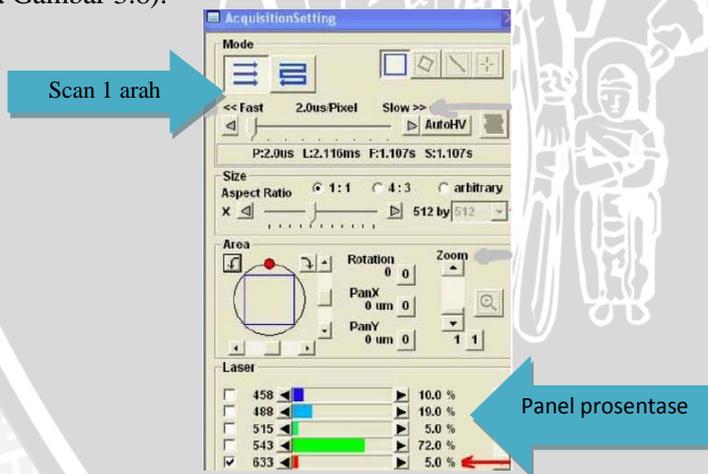
2 sumber laser 60 % dan 10 % 

2 sumber laser 50 % dan 50% 

3 sumber laser 50 %, 35 %, dan 15 % 

Referensi 40 %, 8%, 8% (Hari Soepriandono , dkk) 

Setelah pengaturan program selesai, hasil persiapan bahan diletakkan pada mikroskop. Pengambilan data dimulai dengan mencari spesimen menggunakan lensa okular. Kemudian mengatur penyorotan pada mikroskop dan menampilkan Gambar bulat terang atau yang disebut lapangan pandang yang ditampilkan pada software fluoview. Hal berikutnya yaitu dengan mengatur fokus pada mikroskop untuk menghasilkan bayangan dengan pembesaran lemah dengan cara memutar pemfokus sehingga didapatkan obyek yang paling jelas dan mengatur fokus mikroskop untuk menghasilkan bayangan dengan perbesaran kuat dengan mengubah lensa obyektif karena memiliki perbesaran lemah dengan yang lebih kuat. Setelah didapatkan Gambar yang paling bagus dapat dilakukan scanning spesimen dengan cara menekan tombol mode scan 1 arah (terlihat pada Gambar 3.8).

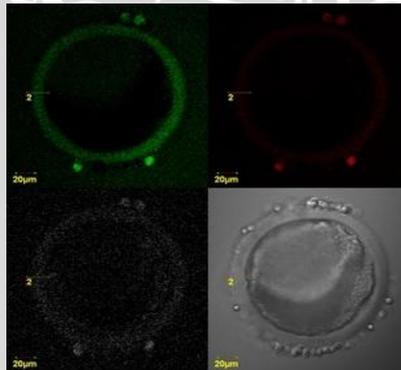


Gambar 3.8 Acquisition setting pada program olympus

Ketika proses scanning selesai, untuk menampilkan Gambar pada mode intensitas tekan Ctrl-H pada keyboard. Kemudian tekan tombol X-Y repeat scanning, maka akan tampil Gambar spesimen pada channel (terlihat pada Gambar 3.9). Untuk mengatur intensitas dari channel maka dapat diatur HV, gain dan offset yang terdapat pada jendela Image Acquisition Control (terlihat pada Gambar 3.6).

Ketika scanning sudah selesai, tampilan Gambar dapat disave dengan cara memilih panel File kemudian Save As. File akan disimpan secara otomatis pada komputer sebagai oib, file ini hanya dapat dibuka pada komputer yang terprogram khusus untuk CLSM.

Pengaturan dimulai dengan mematikan seperangkat mikroskop beserta komputer dan scanner, dilanjutkan dengan membuka program software mikroskop fluoview. Kemudian mencari lapangan pandang dengan mengatur penyinaran pada mikroskop dan menampilkan Gambar bulat terang atau yang disebut lapangan pandang yang ditampilkan pada software fluoview. Hal berikutnya yaitu dengan mengatur fokus pada mikroskop untuk menghasilkan bayangan dengan pembesaran lemah dengan cara memutar pemfokus sehingga didapatkan obyek yang paling jelas mengatur fokus mikroskop untuk menghasilkan bayangan dengan perbesaran kuat dengan mengubah lensa obyektif karena memiliki perbesaran lemah dengan yang lebih kuat.



Gambar 3.9 Hasil fluoresensi spesimen yang telah ditangkap oleh channel. Channel 1 berwarna hijau, channel 2 berwarna kuning, channel 3 berwarna merah, dan DIC berwarna putih.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Halaman ini sengaja dikosongkan



BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Tabel 2. Data Hasil Penelitian

Percoba-an	Persentase Laser (%)			Banyak kejadian FRET		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
1	60	0	0	2	7	9	S
2	60	10	0	22	3	25	B
3	50	50	0	16	1	17	B
4	50	35	15	17	4	21	B
5	50	15	35	13	8	21	B
6	40	8	8	15	9	24	B
7	10	60	0	11	4	15	S
8	0	60	0	11	0	11	S
9	0	60	10	9	3	12	S
10	0	50	50	11	3	14	S
11	15	50	35	14	4	18	B
12	35	50	15	23	7	30	B
13	8	40	8	11	4	15	S
14	0	10	60	3	3	6	S
15	0	0	60	4	2	6	S
16	10	0	60	9	3	12	S
17	50	0	50	16	6	22	B
18	15	35	50	15	1	16	S
19	35	15	50	14	4	18	B
20	8	8	40	9	4	13	S
21	60	0	10	8	7	15	S

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh banyak kejadian FRET, dimana telah dirangkum ke dalam tabel 2. Jumlah kejadian FRET dikelompokkan dari hasil rata-rata dari hasil kejadian FRET pada semua percobaan perubahan prosentase.

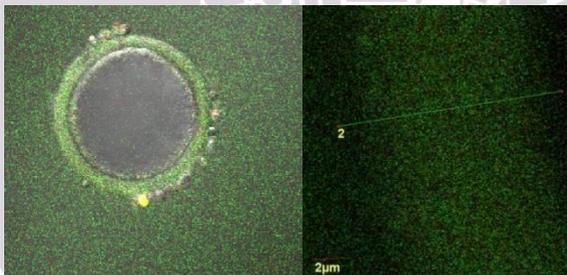
Jumlah total dari kejadian FRET diperoleh sebanyak 329. Dana rata-rata dari kejadian FRET sebanyak 16. Sehingga kejadian FRET dapat dikategorikan, jika kejadian FRET kurang dari 16 maka pada percobaan prosentase tersebut sedikit terjadi FRET. Sedangkan pada percobaan perubahan prosentase dengan kejadian lebih dari 16 maka dianggap banyak terjadi FRET.

Pada tabel 2 ditunjukkan warna hijau merupakan percobaan perubahan prosentase dengan banyak kejadian FRET.

4.2 Hasil Penelitian

4.2.1 Hasil identifikasi terjadinya peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

Hasil reaksi probe Fluo-3 dengan kalsium dalam oosit yang menghasilkan pemendaran, terlihat pada Gambar 4.1 (a) Oosit perbesaran Obyektif 600X tanpa perbesaran digital dan 4.1 (b) hasil perbesaran obyektif 600X dan zoom digital 40X. Untuk mendapatkan data transfer energi harus dilakukan penandaan daerah identifikasi pada oosit, dengan dilakukannya perbesaran diharapkan data yang didapat memudahkan dalam pengidentifikasian terjadinya transfer energi pada daerah yang ditandai tersebut. Pada penelitian ini daerah yang akan diteliti difokuskan pada daerah membran pelusida.

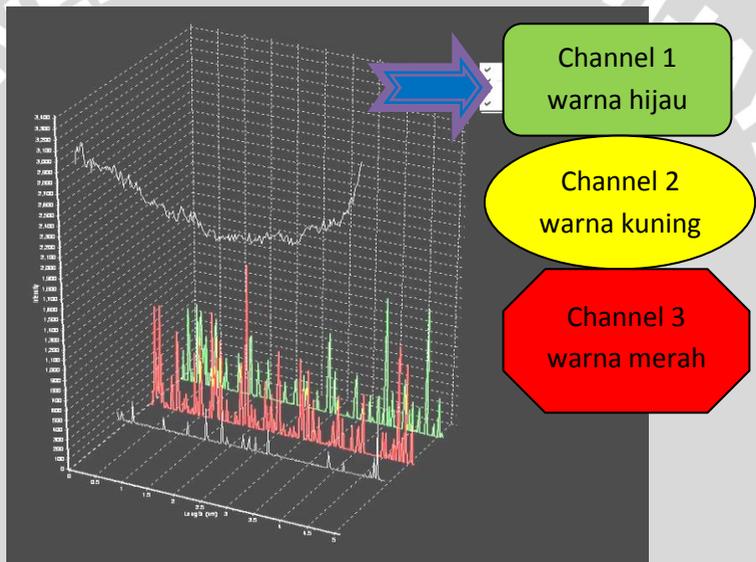


(a)

(b)

Gambar 4.1 Hasil pemendaran kalsium dalam oosit dengan probe Fluo-3. Oosit perbesaran Obyektif 600X tanpa perbesaran digital (a). Oosit hasil perbesaran obyektif 600X dan zoom digital 40X (b).

Hasil penandaan pada spesimen ini kemudian di konversikan ke dalam bentuk grafik intensitas. Jika dibuat grafik akan terlihat seperti pada Gambar 4.2. Kemudian dirubah menjadi file excel dengan cara, memilih Analisis pada jendela program olympus kemudian memilih 3D yang akan menampilkan intensitas berbentuk grafik 3D (terlihat pada Gambar 4.2 (b)).



Gambar 4. 2 Analisis data dalam bentuk grafik 3D.

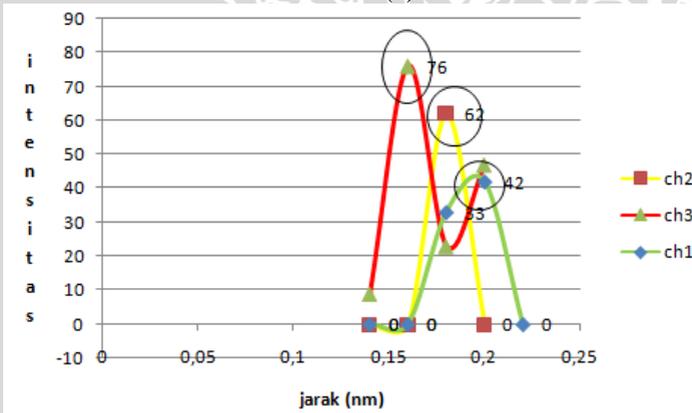
Terlihat pada Gambar 4.2, intensitas hasil fluoresensi terlalu berhimpit dan sulit untuk diidentifikasi, sehingga data intensitas tersebut diubah ke dalam bentuk excel untuk mempermudah pengidentifikasian transfer energi (FRET) dengan jarak yang lebih dekat. Pengidentifikasian transfer energi dengan merubah data hasil grafik 3D ke file excel, dengan cara mengarahkan kursor pada Gambar grafik 3D, kemudian klik kanan dan pilih save as dengan pilihan file ekstensi *.xls atau excel. Terlihat pada Gambar 4.3 pada

file excel akan muncul kolom length atau panjang lintasan spesimen yang ditandai, dan intensitas dari tiap channel.

Dari data excel tersebut diseleksi kemungkinan terjadinya transfer energi (FRET) dari hijau ke kuning atau kuning ke merah dengan jarak 10 nm – 40 nm. Karena syarat terjadinya transfer energi adalah adanya donor dan acceptor

Length (um)	Ch1	Ch2	ch3
	536nm	596nm	666nm
0	413	0	14
0,02	0	0	8
0,04	0	0	15
0,06	0	208	12
0,08	540	231	12
0,1	0	31	15
0,12	0	2	10
0,14	0	0	9
0,16	0	0	76
0,18	33	62	23
0,2	42	0	47

(a)



(b)

jarak (nm)	prosentase laser (%)		
	λ 488 nm,	λ 543 nm,	λ 633 nm
	60%,	10%,	0%
0			
20			
40			
60			
80			
100			
120			
140			
160			
180			
200			

(c)

Gambar 4.3 Analisa data transfer energi. Data yang berbentuk excel (a) kemudian dianalisa dalam bentuk grafik (b) dan untuk lebih memudahkan analisa diubah kebentuk sederhana (c).

Proses pengidentifikasian dimulai dari penentuan filter penangkap atau channel. Filter memiliki warna yang berbeda dengan panjang gelombang yang berbeda pula. Warna hijau, kuning dan merah pada Gambar 4.3 (a) diindikasikan sebagai fluoresensi yang ditangkap oleh channel karena hasil deeksitasi energi oleh elektron mengakibatkan energi terlepas sebagai spektrum cahaya dengan panjang gelombang (λ) dan energi tertentu, panjang gelombang (λ) inilah yang ditangkap oleh channel. Setiap channel memiliki filter dengan rentang panjang gelombang yang berbeda. Panjang gelombang (λ) hasil fluoresensi ini dapat melalui channel jika berada pada range puncak panjang gelombang (λ) dye filter pada channel yang telah ditentukan.

Nilai – nilai intensitas yang tertampil pada excel kemudian diidentifikasi puncak – puncak yang memungkinkan terjadinya transfer energi dengan jarak terdekat, yang kemudian di rubah menjadi grafik yang terlihat pada Gambar 4.2 (b).

Pada penelitian ini data titik fluoresensi tertampil dengan kelipatan setian 20 nm. Sehingga jarak kejadian FRET pada penelitian ini ditentukan dengan jarak 20 nm – 40 nm. Salah satu contoh data yang menampilkan terjadinya FRET ditampilkkan pada Gambar 4.3. Terlihat bahwa terjadi FRET pada jarak 200 nm dari tepi sel. Dari hijau (200 nm) ke kuning (180 nm) dan dari kuning (180 nm) ke merah (160 nm).

Transfer energi hanya dapat terjadi dari energi tinggi ke energi yang rendah. Energi yang dibawa laser berbanding terbalik

dengan panjang gelombang dari laser tersebut. Ketika panjang gelombang laser kecil maka energi yang dibawanya besar. Sebaliknya apabila nilai panjang gelombang itu besar energi yang dibawa kecil.

Penelitian ini menggunakan 3 sumber laser yaitu laser argon 488 nm, laser HeNe Green 543 nm dan laser HeNe Red 633 nm. Ada beberapa variasi perubahan prosentase seperti terlihat pada tabel 2. Pasangan – pasangan prosentase ini dibuat dengan perkiraan bahwa jumlah prosentase tiap laser adalah 100%. Dengan begitu apabila salah satu laser dinyalakan dalam prosentase maksimal 100%, maka akan membuat laser tersebut bekerja dengan kekuatan penuh sehingga dapat merusak sumber laser dan mempengaruhi kualitas hidup sel telur yang diteliti. Karena pada penelitian ini digunakan 1 sampel untuk semua pasangan perubahan prosentase. Maka dari itu dipilih prosentase maksimal tiap lasernya yaitu 60%. Prosentase besar kecil hanya digunakan 2 laser yaitu prosentase maksimal (60%) pada salah satu laser, prosentase kecil (10%) pada laser lainnya dan laser sisanya tidak dinyalakan, dengan cara memposisikan prosentase pada nilai 0%. Pada pasangan prosentase ini diharapkan dapat memberikan informasi bagaimana jika input laser maksimal ditambah dengan input laser bernilai kecil. Prosentase sama dipilih dengan harapan mendapatkan informasi, apabila 2 laser dinyalakan dengan nilai yang sama, mendekati nilai prosentase maksimal(50%). Prosentase besar, sedang dan kecil diharapkan dapat memberikan informasi bahwa bagaimana hasil yang didapatkan apabila semua laser dinyalakan dengan nilai prosentase yang tidak sama yaitu prosentase mendekati maksimal (50%), prosentase sedang (35%), dan prosentase kecil (15%). Pasangan prosentase yang terakhir yaitu prosentase referensi. Prosentase ini merupakan pasangan prosentase awal yang digunakan pada penelitian sel hidup oleh peneliti sebelumnya dengan menggunakan *confocal laser scanning microscopy* (CLSM). Pasangan – pasangan prosentase ini diulangi hingga semua laser dapat menggunakan pasangan laser yang sudah dibuat.

4.2.2 Hasil identifikasi perubahan prosentase laser

Hasil *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) didapat dari hasil fluoresensi yang ditangkap oleh filter dan detektor yang kemudian dirubah menjadi grafik intensitas oleh program yang selanjutnya disimpan dalam bentuk excel. Dan diidentifikasi terjadinya FRET dengan melihat jarak terdekat tertampil pada tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Penelitian

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
1	60	0	0	2	7	9	S
8	0	60	0	11	0	11	S
15	0	0	60	4	2	6	S
2	60	10	0	22	3	25	B
7	10	60	0	11	4	15	S
9	0	60	10	9	3	12	S
14	0	10	60	3	3	6	S
16	10	0	60	9	3	12	S
21	60	0	10	8	7	15	S
3	50	50	0	16	1	17	B
10	0	50	50	11	3	14	S
17	50	0	50	16	6	22	B
4	50	35	15	17	4	21	B
5	50	15	35	13	8	21	B
11	15	50	35	14	4	18	B
12	35	50	15	23	7	30	B
18	15	35	50	15	1	16	S
19	35	15	50	14	4	18	B
6	40	8	8	15	9	24	B
13	8	40	8	11	4	15	S
20	8	8	40	9	4	13	S

Filter – filter penangkap memiliki warna – warna yang berbeda tiap lasernya filter pada channel pertama menunjukkan warna hijau dengan range panjang gelombang emisi pada daerah Calcium Green2 (536 nm). Filter kedua menunjukkan warna kuning dengan range panjang gelombang emisi pada daerah Cy 3,5 (594 nm). Dan filter ketiga pada channel ketiga menunjukkan warna merah dengan range panjang gelombang emisi pada daerah Cy 5 (666 nm), daerah range panjang dye filter terlampir pada lampiran.

Hasil fluoresensi yang ditangkap oleh detektor hingga menampilkan warna fluoresensi tiap channelnya dan diidentifikasi sebagai kejadian FRET dapat dijelaskan menggunakan metode diagram Jablonski. Gambar diagram Jablonski dengan menggunakan berbagai macam sumber eksitasi berupa laser ditampilkan pada Gambar 4.4 untuk 1 sumber eksitasi Argon 488 nm, Gambar 4.5 untuk 2 sumber eksitasi Argon 488 nm dan HeNe G 543 nm, Gambar 4.6 untuk 2 sumber eksitasi Argon 488 nm dan HeNe R 633 nm, dan Gambar 4.7 untuk sumber eksitasi Argon 488 nm, HeNe G 543 nm dan HeNe R 633 nm.

Pada semua diagram Jablonski tersebut memiliki prinsip yang sama hanya saja berbeda saat adanya sumber eksitasi lain yang datang bersama, sehingga mempengaruhi hasil fluoresensi.

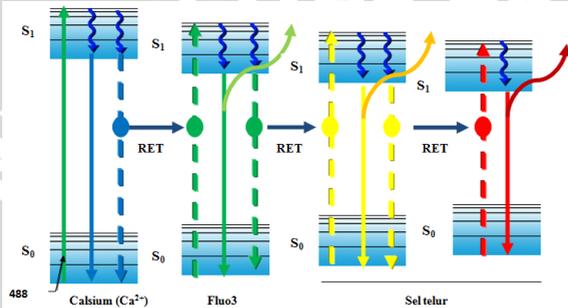
FRET terjadi karena adanya transfer energi secara non radiatif dari donor ke acceptor. Sistematis terjadinya FRET dimulai dari eksitasi energi tinggi dari laser yang memasuki scan head pada mikroskop diserap oleh kalsium (donor) secara resonansi sehingga mengakibatkan atom pada keadaan ground state S_0 tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi disini digambarkan pada tingkat S_1 . Ketika atom tersebut sudah menyerap energi yang besar ke tingkat energi yang tinggi maka atom tersebut tidak stabil sehingga harus melepaskan kembali energi yang dibawa agar bisa kembali tingkat energi yang lebih rendah tidak harus ke keadaan semula (deeksitasi). Pelepasan energi tersebut terbagi menjadi 2 cara, yaitu secara radiatif dan non radiatif. Secara radiatif pelepasan energi mengakibatkan terjadinya pancaran spektrum cahaya (fluoresensi) yang akan ditangkap oleh filter penangkap sebagai intensitas donor. Secara non radiatif dimana energi nonradiatif ini di transferkan ke acceptor (Fluo-3) secara resonansi sehingga mengakibatkan atom pada Fluo-3 tereksitasi dan deeksitasi memancarkan spektrum

cahaya yang nantinya akan ditangkap oleh filter penangkap sebagai intensitas akseptor. Energi yang dilepaskan oleh kalsium tidak besar sehingga hasil fluoresensinya tidak tertangkap oleh channel atau filter. Filter - filter penangkap pada penelitian ini diatur dalam range panjang gelombang Calcium Green 2, Cy 3,5 , Cy 5. Apabila panjang gelombang spektrum cahaya tersebut tidak dalam range panjang gelombang filter – filter ini maka spektrum cahaya tersebut tidak dilewatkan filter sehingga tidak dapat terdeteksi oleh detektor. Sedangkan hasil deeksitasi pada Fluo-3 mengakibatkan fluoresensi yang besar hingga dapat ditangkap oleh filter Calcium Green 2 dengan warna filter atau channel dalam range warna hijau hingga hijau kekuningan dan ada pula sisa energi yang ditransferkan atau di kirimkan ke bagian sel telur dengan cara beresonansi pula. Energi yang ditransferkan ditangkap oleh atom yang kemudian mengalami eksitasi dan deeksitasi kembali dengan memancarkan spektrum cahaya ataupun berfluoresensi yang dapat ditangkap oleh filter Cy 3,5 dengan range panjang gelombang dengan warna kuning hingga orange dan sisa energinya ditransferkan ke bagian dalam sel lagi sehingga mengakibatkan eksitasi dan deeksitasi lagi sehingga memancarkan fluoresensi sehingga ditangkap oleh filter Cy 5 dengan warna kuning hingga merah. Hal ini akan terjadi terus menerus hingga energi yang di bawa masuk oleh laser habis. Akan tetapi pada penelitian ini hanya terdapat 3 filter saja. Sehingga spektrum cahaya hasil deeksitasi dengan pancaran cahaya fluoresensi yang besar yang dapat ditangkap oleh filter dan hanya hasil fluoresensi dengan range panjang gelombang dye filter saja yang dapat ditangkap oleh detektor. Hasil warna fluoresensi ini hanya dapat menampilkan titik warna dan letak titik fluoresensi, sehingga transfer energi yang didapatkan hanya memunculkan warna dye filter saja. Warna ini digunakan sebagai tanda terjadinya transfer energi dari channel 1 hijau ke channel 2 kuning dan ke channel 3 merah. Channel 1 menunjukkan warna hasil fluoresensi dari fluo-3, channel 2 dan channel 3 menunjukkan fluoresensi dari bagian sel.

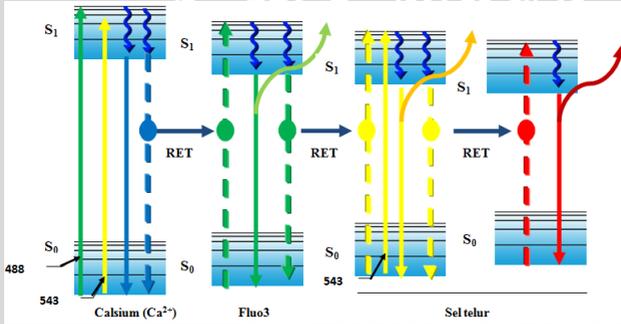
Fluoresensi yang ditangkap oleh detektor tidak semuanya berasal dari eksitasi sumber laser, namun adapula efek dari pemancaran langsung atau autofluorescence dari bagian sel tersebut hingga menambah ataupun mengganggu hasil fluoresensi yang masuk ke dalam filter dan terdeteksi sebagai FRET. Hal ini dapat

dilihat dari ilustrasi diagram Jablonski dengan beberapa perbedaan jenis laser dan intensitas yang digunakan.

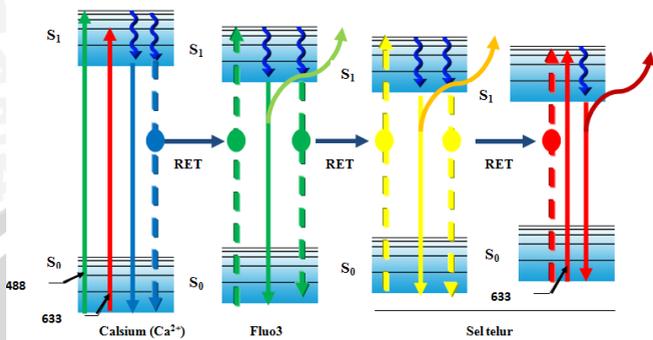
Saat laser HeNe G 543 nm ikut tereksitasi pada Gambar 4.5, hal ini tidak menutup kemungkinan pada sel telur terjadi eksitasi dari sumber laser HeNe G 543nm, dan tidak hanya mendapatkan energi dari hasil transfer energi secara resonansi dari Fluo-3. Hal ini pula terjadi saat penambahan sumber eksitasi HeNe Red 633nm terlihat pada Gambar 4.6 dan Gambar 4.7.



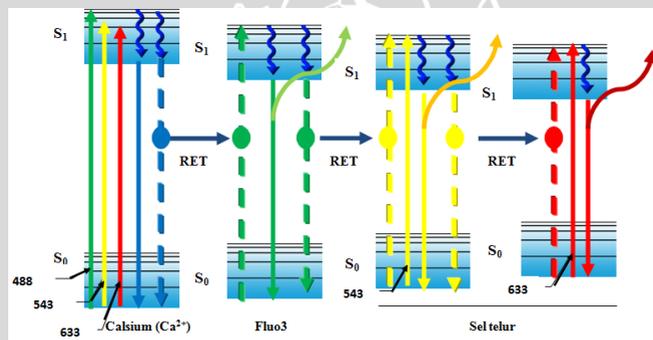
Gambar 4.4 Diagram Jablonski 1 sumber laser Ar 488 nm



Gambar 4.5 Diagram Jablonski 2 sumber, laser Ar 488nm dan laser HeNe G 543 nm



Gambar 4.6 Diagram Jablonski 2 sumber, laser Ar 488nm dan laser HeNe R 633 nm



Gambar 4.7 Diagram Jablonski 3 sumber, laser Ar 488nm, laser HeNe G 543 nm dan laser HeNe R 633 nm

Dari data yang telah didapat, ditemukan bahwa ada beberapa kejadian FRET yang janggal, yaitu ketika laser 488nm saja dinyalakan terjadi kejadian FRET dari kuning ke merah, sedangkan saat laser Argon tidak dinyalakan terjadi kejadian FRET dari hijau ke kuning, dan beberapa pasangan prosentase yang menghasilkan banyak kejadian FRET.

Pada tabel 4 menunjukkan, ketika hanya menggunakan salah satu sumber laser tidak menunjukkan banyak kejadian FRET. Ketika laser 488 nm dinyalakan hanya terdapat kejadian FRET sebanyak 2 hijau ke kuning, dan 7 kuning ke merah. Saat laser HeNe Green 543 nm dinyalakan terjadi kejadian transfer energi 11 hijau ke kuning

dan tidak terdapat transfer energi dari kuning ke merah. Sedangkan pada saat hanya laser 633nm dinyalakan terdapat kejadian transfer energi dari hijau ke kuning 4 dan kuning ke merah 2. Dari hasil ini dapat dilihat terjadi kejanggalan dimana saat salah satu laser tidak dinyalakan, diharapkan warna dari laser tersebut tidak menyebabkan FRET pada warna yang sama, akan tetapi dari penelitian ini memnunjukkan hal yang berlawanan, hal ini bukan disebabkan oleh kebocoran dari sumber laser, karena ketika prosentase laser diletakkan pada keadaan 0% maka laser tersebut tidak akan masuk ke scan head.

Tabel 4. Hasil penelitian menggunakan 1 sumber laser

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
1	60	0	0	2	7	9	S
8	0	60	0	11	0	11	S
15	0	0	60	4	2	6	S

Tabel 5. Hasil penelitian menggunakan 2 sumber laser

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
2	60	10	0	22	3	25	B
7	10	60	0	11	4	15	S
9	0	60	10	9	3	12	S
14	0	10	60	3	3	6	S
16	10	0	60	9	3	12	S
21	60	0	10	8	7	15	S

Pada tabel 5 merupakan percobaan perubahan prosentase menggunakan 2 sumber laser. Dapat dilihat pada tabel 5 bahwa hanya pada percobaan 2 yaitu saat laser Argon 488 nm dengan prosentase 60% dan laser HeNe Green 543 nm 10 % mendapatkan banyak terjadi transfer energi, khususnya banyak kejadian transfer

energi dari hijau ke kuning sebanyak 22 dan kuning ke merah hanya 3.

Tabel 6. Hasil penelitian menggunakan 2 sumber laser dengan nilai intensitas sama

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
3	50	50	0	16	1	17	B
10	0	50	50	11	3	14	S
17	50	0	50	16	6	22	B

Sedangkan pada tabel 6 perubahan prosentase dengan nilai yang sama yaitu 50% pada kedua laser yang digunakan, diperoleh banyak kejadian transfer energi saat laser Argon 488 nm digunakan. Percobaan 3 laser 488 nm dan laser 543 nm diperoleh hijau ke kuning 16 dan kuning ke merah 1, sedangkan laser 488 nm dengan laser 633 nm diperoleh hijau ke kuning 16 dan kuning ke merah 6.

Tabel 7. Hasil penelitian menggunakan 3 sumber laser

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
4	50	35	15	17	4	21	B
5	50	15	35	13	8	21	B
11	15	50	35	14	4	18	B
12	35	50	15	23	7	30	B
18	15	35	50	15	1	16	S
19	35	15	50	14	4	18	B

Ketika ketiga laser digunakan banyak kejadian FRET yang terdeteksi, seperti yang tertampil pada tabel 7. Jumlah kejadian FRET terbanyak terdapat pada percobaan no 12, yaitu diperoleh hijau ke kuning 23 dan kuning ke merah 7 dengan pasangan prosentase laser 488 nm 35 %, laser HeNe G 543 nm 50 %, dan laser

HeNe R 633 nm 15 %. Jumlah kejadian FRET terbanyak kedua setelah percobaan no 12 yaitu percobaan no 4 dan 5, saat laser Argon 488 nm dalam prosentase 50 % diperoleh jumlah kejadian FRET sebanyak 21. Dan dari semua pasangan prosentase ini hanya terdapat 1 kejadian FRET yang berkategori sedikit, yaitu berjumlah 16 dimana laser Argon 488 nm dengan prosentase 15%, laser HeNe G 543 nm 35%, dan laser HeNe R 633 nm 50%.

Dan ketika menggunakan percobaan laser referensi dari penelitian (Hari soepriandono, dkk) hanya terdapat 1 kejadian FRET dengan kategori banyak yaitu pada percobaan no 6 saat laser Argon 488 nm dengan prosentase 40 %, laser 543nm 8%, dan laser 633 nm 8%. Diperoleh jumlah kejadian FRET 24, hijau ke kuning 15 dan kuning ke merah 9.

Tabel 8. Hasil penelitian menggunakan 3 sumber laser referensi penelitian (Hari soepriandono, dkk)

Percobaan	Persentase Laser (%)			Transfer energi		Jumlah	Kategori
	488 nm	543 nm	633 nm	H ke K	K ke M		
6	40	8	8	15	9	24	B
13	8	40	8	11	4	15	S
20	8	8	40	9	4	13	S

Dari semua hasil transfer energi, banyak kejadian FRET terjadi pada hijau ke kuning dan hanya sedikit kuning ke merah terjadi transfer energi yaitu berkisar antara 1 hingga 9 kejadian FRET. Dan kejadian FRET rata – rata terbanyak yaitu saat prosentase laser pada laser Argon 488nm berada dalam posisi prosentase besar dibandingkan dengan prosentase laser lainnya.

Dari analisa yang telah dijelaskan sebelumnya, dapat ditarik garis besarnya bahwa saat intensitas laser bernilai besar pada setiap laser tidak ada pengaruh yang besar, akan tetapi apabila intensitas bernilai besar pada laser yang memiliki energi terbesar memiliki variasi banyak terjadinya transfer energi. Dan pasangan prosentase dengan 3 sumber laser memiliki variasi terjadinya FRET terbanyak. Range warna tiap panjang gelombang dapat dilihat pada lampiran.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Meskipun data yang diperoleh random karena letak kalsium yang acak di dalam oosit, sehingga tidak dapat diprediksi letak terjadinya transfer energi, tetapi pada penelitian ini daerah bagian sel yang digunakan dipusatkan pada daerah membran pelusida. Syarat terjadinya transfer energi yaitu jarak antara donor dan acceptor harus dengan jarak terdekat dan memiliki range yang lebar.

Dari penelitian ini didapatkan hasil identifikasi transfer energi paling banyak yang mendominasi adalah pasangan prosentase saat ketiga laser dinyalakan, dan dapat disimpulkan bahwa nilai prosentase (intensitas) pada setiap laser (sebagai sumber eksitasi) tidak mempengaruhi terjadinya transfer energi (FRET), tetapi besarnya energi yang dibawa oleh sumber eksitasi dapat mempengaruhi banyak atau sedikit terjadinya peristiwa transfer energi (FRET) dalam oosit.

5.2 Saran

Untuk menambah informasi yang lebih, pada penelitian selanjutnya dibutuhkan banyak data atau banyak variasi perubahan prosentase yang diatur.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Halaman ini sengaja dikosongkan



DAFTAR PUSTAKA

- Berney, C. a. G. D. 2003. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical* 84 (6): 3992.
- Blakely, J. d. D. H. B. 1991. Ilmu Peternakan. Edisi ke-4, Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Brochan, C. 2001. *New Trends In Fluorescence Spectroscopy*. Wiley New York. USA.
- Campbell, N. A. 2004. *Biologi*. Ed. 5, Erlangga. Jakarta.
- Carrol, J., k. swann, et al. . 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations durng the growth and meiotic maturation oocytes. *Great Britain The Company of Biologists* 120: 3507-3517.
- Dos Remindos, M. M., dan Barder J. A. 1987. Fluorescence Resonance Energy Transfer measurement of distance in actin and myosin. A critical evaluation, *J. MuscleRes Cell*.
- Fellers, T. J. a. M. W. D. 2007. Applications in Confocal Microscopy, Cameleons: Calcium Ion Probes. *Olympus Fluoview Resource Center*.
- Fox, S. I. 2004. *Human Physiology*. eight edition, Mc. Graw-hill Compnsies, inc. new york.
- Gordon, G. W., G. Berry, X.H. Liang, B. Levine, and B. Herman. 1998. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 74: 2702–2713.
- Hadi, B. S. (2008, 17 November 2008). Spektrum Gelombang Elektromagnetik. Akses tanggal 19 September 2012, dari aktifisika.wordpress.com/2008/11/17/spektrum-gelombang-elektromagnetik/.
- Hasegawa, A., K. Koyama, Y. Okazaki, M. Sugimoto dan R. Isojima. 1994. Amino Acid Sequence of Porcine Zona Pellucida GLycoprotein ZP4 Determined by Peptide Mapping and cDNA Cloning. *J. Reprod. Fert.* 1000: 245-255.
- Hussain, S. A. 2008. *An Introduction to fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)* Tripura University. India.
- Ismudiono. 2010. *Fisiologi dan Reproduksi Pada Ternak*. Surabaya.

- kline, D. (1994). Attributes and Dynamics of the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Eggs. Akses tanggal 4 maret 2013, dari http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=PubMed&list_uids=10948453&dopt=abstract.
- kline, D., L. Mahlmann, C. Fox dan M. Terasaki. 1999. The Cortical Endoplasmic Reticulum (ER) of Mouse Egg : Localisation of ER Clusters in Relation to the Generation of Repetitive Calcium Waves. . *Development Biology*. 215: 431-442.
- lakowicz, J. R. 2006. Principles of Fluorescence Spektroskopi 3rd ed. Springer. Singapore.
- Mason. 1999. Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity. Akademy Press. New York.
- Nathan S. Claxton, T. J. F., and Michael W. Davidson. LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY.
- olympus, a. (2012, 10 juli 2013). microscopy resource center. [cameleons : calcium ion probes](http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/applications/comeleons.html) Akses tanggal 12 juli 2013, 2013, dari <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/applications/comeleons.html>.
- Stelzer, E. H. K. 2000. Practical Limits to Resolution in Fluorescence Light Microscopy, in R. Yuste, F. Lanni, A. Konnerth (eds.). Cold Spring Harbor Press. New York.
- Takashi, a., dkk. 1999. Measurement of Intracellular Calcium. technologies, 1. (2012). Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with Visible Light—Section 19.3. Akses tanggal 16 september, 2012, dari <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-Visible-Light.html>.