

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2016 sampai Mei 2017 di Laboratorium Sel dan Kultur Embrio, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH-UB), dan Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

3.2 Koleksi cairan ovarium sapi

Cairan folikel sapi yang digunakan diambil dari folikel kecil berukuran $< 7\text{mm}$. Aspirasi cairan folikel menggunakan *disposable syringe* 10 ml dengan spuit berukuran 18 G. Cairan folikel selanjutnya di-*pooling* pada tabung *eppendorf* dan disentrifus 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan cairan folikel dengan sel granulosa dan oosit. Supernatan disaring menggunakan *milipore* filter $0,22\ \mu\text{m}$ dan dimasukkan pada tabung *eppendorf* steril. Cairan folikel kemudian diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit pada waterbath dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20°C (Hua dkk, 2011; Haris, 2014).

3.3 Elektroforesis Carian Folikel Kecil Sapi

Pembuatan *separating gel* dengan cara mencampurkan bahan-bahan untuk *separating gel* yaitu Poliakrilamid $2300\ \mu\text{l}$, Tris-HCl pH 8,8 $1300\ \mu\text{l}$, dH_2O $1600\ \mu\text{l}$, amonium persulfat (APS) sebanyak $75\ \mu\text{l}$, sodium dedosil sulfat (SDS) 10% $75\ \mu\text{l}$, dan tetrametile diamina (TEMED) $5\ \mu\text{l}$. Campuran homogen dan dimasukan ke dalam *plate*. Pembuatan *stacking gel* 5% dengan mencampurkan bahan-bahan *stacking gel* sampai homogen yaitu Poliakrilamid $450\ \mu\text{l}$, Tris-HCl pH 8,8 $380\ \mu\text{l}$, dH_2O $2100\ \mu\text{l}$, APS sebanyak $30\ \mu\text{l}$, SDS 10% $30\ \mu\text{l}$, dan TEMED $5\ \mu\text{l}$.

Cairan folikel kecil sebanyak $5\ \mu\text{l}$ ditambah pewarna RSB $5\ \mu\text{l}$ dengan perbandingan 1:1. Campuran RSB dan sampel kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Pasang gelas *plate* yang berisi *separating gel* dan *stacking gel* kedalam elektroforesis dan gelas *plate* difiksasi. Sampel dimasukan ke dalam sekat sekat *comb*.

Kemudian dinyalakan dengan voltase 130 v dan kuat arus sebesar 60 mA. Gel hasil elektroforesis direndam dengan larutan *staining* selama 1 hari dan direndam dengan larutan *destaining* untuk hari berikutnya.

3.4 Maturasi Oosit secara In Vitro

3.4.1 Desain penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kelompok perlakuan maturasi sebagai berikut :

- P0 : Kontrol Maturasi (TCM-199 + Penstrep + 10% FBS),
- P1 : Maturasi dengan suplementasi cairan folikel 20% (TCM-199 + Penstrep + 20% cairan folikel).

3.4.2 Maturasi Oosit *In Vitro*

Ovarium kambing didapat dari RPH Gadang, Malang dalam keadaan segar sesaat setelah kambing dipotong. Ovarium yang telah dibersihkan dari jaringan lemak di sekitarnya, dimasukkan ke dalam botol yang berisi NaCl fisiologi 0,9% yang telah ditambah streptomycin 0,01 gr/10 ml dan penicillin 0,006 gr/10 ml. Botol yang telah berisi ovarium dimasukkan kedalam termos berisi air hangat yang suhunya berkisar antara 35°C-37°C

Oosit dipeoleh dengan cara melakukan aspirasi pada folikel ovarium dengan menggunakan spuit atau *disposable syringe* 10 ml, dengan jarum berukuran 21G. Proses berikutnya adalah *washing* dengan media TCM-199 yang ditambah dengan antibiotik dengan pH media 7,4 dan diulang sebanyak tiga kali, selama proses ini oosit diklasifikasi berdasarkan kualitas. Hanya oosit dengan kualitas A dan B yang dikultur dalam media baik kontrol maupun perlakuan. Media maturasi diinkubasi pada suhu 37° C dengan 5% CO₂ minimal 2 jam sebelum digunakan, media oosit dalam bentuk media drop 100 µl dan dilapisi *paraffin oil*. Kemudian inkubasi pada suhu 37° C dengan 5% CO₂ selama 26 jam (Bilqis dkk, 2016; Haris dkk, 2014).

Oosit yang telah diinkubasi, kemudian diamati dengan mikroskop inverted perbesaran 100x untuk melihat tingkat ekspansi dari sel kumulus.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian berupa data tingkat ekspansi cumulus (1,2,3) dianalisis menggunakan IBM SPSS Statistic 2.0 menggunakan Uji T. Data hasil elektroforesis SDS PAGE berupa pita protein dianalisis berat molekulnya (BM).