

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *post test only control group design* yaitu dengan membandingkan hasil yang didapat pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Secara umum, penelitian dibagi menjadi 2 tahapan yaitu: (1). Pembuntingan mencit dan inokulasi *Plasmodium berghei* galur ANKA untuk mencit bunting perlakuan, (2). Pemeriksaan derajat parasitemia dan pembedahan pada hari ke 18 pasca kawin serta pengambilan sampel jaringan plasenta untuk pemeriksaan ekspresi GLUT-1.

Hewan coba dibagi dalam 2 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol yang merupakan kelompok mencit bunting sehat, tanpa diinokulasi *Plasmodium berghei* dan 1 kelompok perlakuan yang diinokulasi dengan *Plasmodium berghei*. Penghitungan jumlah hewan coba yang diperlukan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut,

$$p(n-1) \geq 16$$

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan dan n harus

bilangan bulat,

sehingga : $2(n-1) \geq 16$

$$n-1 \geq 8$$

$$n \geq 9$$

Dari rumus tersebut diperoleh jumlah sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok adalah 9, sehingga mencit yang diperlukan untuk penelitian ini berjumlah 18 ekor.

4.2 Kriteria Inklusi Mencit

Kriteria inklusi pengambilan sampel mencit adalah:

1. Mencit BALB/c betina umur 13-16 minggu
2. Berat badan mencit 20-30 gram
3. Tidak cacat fisik
4. Belum pernah bunting
5. Dibuntingkan melalui sinkronisasi oestrus

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu jumlah infeksi *Plasmodium berghei*.
2. Variabel antara dalam penelitian ini yaitu ekspresi GLUT-1 di jaringan plasenta.
3. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu berat badan janin mencit.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam rentang waktu antara bulan Desember 2012 hingga bulan April 2013.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Perawatan Mencit

Alat-alat yang digunakan untuk perawatan mencit adalah kandang mencit (masing-masing untuk satu ekor mencit) dan botol minum mencit. Bahan-bahan yang digunakan adalah makanan mencit (BR1 pakan olahan ternak untuk memenuhi kecukupan nutrisi mencit), air suling, tepung terigu, kecambah kacang hijau, dan sekam (Sardjono, 2007).

4.5.2 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Alat-alat yang digunakan untuk inokulasi *P. berghei* antara lain tabung *ependorf*, tabung *falcon* 15 ml, pipet mikro, mikroskop, pinset, gunting steril, hemositometer, spuit insulin 1 ml, *object glass*, tabung gelas ukur, dan pipet kaca. Bahan-bahan yang digunakan antara lain *Plasmodium berghei* dari darah mencit terinfeksi, larutan PBS, larutan M+, EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*), larutan Giemsa, kapas alkohol, methanol p.a, dan buffer Giemsa.

4.5.3 Pengukuran Derajat Parasitemia dan Jumlah Eritrosit

Alat-alat yang digunakan untuk pengukuran derajat parasitemia antara lain gelas obyek, tabung *falcon*, gunting steril, mikroskop, *hand counter* dan pipet tetes. Bahan-bahan yang digunakan adalah kapas alkohol, buffer Giemsa, larutan Giemsa, methanol p.a., dan minyak imersi.

4.5.4 Pengambilan Sampel Plasenta (Pembedahan Mencit)

Alat-alat yang digunakan untuk pengambilan sampel plasenta (pembedahan mencit) adalah gunting, kasa, scalpel, botol plastik tempat plasenta, pinset, neraca analitis Mettler AE 50, dan toples besar. Bahan- bahan yang digunakan adalah kloroform dan formalin.

4.5.5 Pembuatan Preparat Jaringan Plasenta

Pembuatan preparat histologis dilakukan di Laboratoium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

4.5.6 Pemulasan Imunohistokimia

Alat-alat yang dibutuhkan untuk pemulasan Imunohistokimia yaitu *yellow tip*, pipet, *ependorf*, sentrifugator (Vortex), *staining chamber*, dan entellan. Sedangkan bahan yang digunakan adalah *Anti GLUT-1 Antibody* dari Abcam dengan nomor katalog ab652, *Diaminobenzidine* (DAB), H_2O_2 , *methanol*, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Triton*, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Streptavidine Horseradish Peroxidase* (SAHRP), dan *counterstain Hematoxilin Mayer*.

4.6 Definisi Operasional

1. Umur kebuntingan mencit dihitung mulai setelah mencit dikawinkan
2. *Plasmodium berghei* adalah Plasmodium yang menginfeksi mencit. Pada manusia memberi gejala yang sama dengan *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium berghei* galur ANKA ini di dapatkan dari Laboratorium

Parasitologi Universitas Brawijaya. Plasmodium ini diinfeksi pada mencit galur BALB/c dengan konsentrasi parasit 10^6 dalam 0,2 mL darah secara intraperitoneal yang diinokulasikan pada hari ke-9 pasca kawin.

3. Derajat parasitemia: persentase jumlah parasit yang dihitung diantara 1000 sel darah merah pada sediaan tetes tipis yang diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x.
4. Berat badan janin rendah adalah salah satu akibat dari malaria transplasenta pada janin yang dideteksi dengan cara menimbang berat badan janin menggunakan neraca analitik Metler AE50.
5. *Glucose Transporter Isoform 1* (GLUT-1) adalah protein pengangkut glukosa utama pada jaringan plasenta di membran sel trofoblas. Ekspresi GLUT-1 diukur dengan menghitung ekspresinya pada sediaan histo-PA dalam 20 lapang pandang mikroskop yang diwarnai dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan Anti GLUT1 Antibody dari Abcam dengan nomor katalog ab652. *Glucose Transporter Isoform 1* (GLUT-1) yang positif menunjukkan warna coklat yang mengitari membran plasma trofoblas dan sel plasenta.

4.7 Prosedur Penelitian Tahap Satu

4.7.1 Pembuntingan Mencit

Pembuntingan mencit dilakukan secara simultan setelah dipersiapkan sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan fenomena biologis yaitu *Leeboot effect*, *Pheromone effect*, dan *Whiten effect* (Sardjono, 2005). Caranya adalah mencit

betina dikandangkan sesama betina selama waktu aklimatisasi 7-10 hari. Dengan cara ini mencit akan berada dalam kondisi un-oestrus (*Leeboot effect*). Mencit betina yang telah dipisahkan tersebut akan memulai siklus birahinya bila dipapar dengan bau-bauan yang berasal dari pejantan, misalnya urin (*Pheromone effect*). Dengan cara ini mencit betina akan mengalami birahi pada malam ke 3 setelah pemaparan (*Whitten effect*). Mencit dikawin selama 1 malam dengan rasio 1:1.

4.7.2 Inokulasi *Plasmodium berghei* Galur ANKA pada Mencit Donor

Inokulasi *P. berghei* galur ANKA untuk mencit donor dilakukan dengan menginokulasikan *P.berghei* galur ANKA (hasil *thawing* dari liquid nitrogen) secara intraperitoneal ke mencit donor, kemudian setelah hari ke-4 setelah inokulasi, dilakukan penghitungan parasitemia. Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis yang diambil dari ujung ekor dan telah dipulas dengan pewarna *Giemsa*. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop pembesaran 1000x. Setelah parasitemia mencit donor di atas 15%, berarti mencit donor tersebut telah siap digunakan sebagai donor infeksi mencit perlakuan.

4.7.3 Inokulasi *Plasmodium berghei* Galur ANKA pada Mencit Kelompok

Perlakuan

Inokulasi hewan coba dilakukan pada hari ke sembilan setelah perkawinan mencit (organogenesis). Inokulasi dilakukan dengan menginjeksikan *Plasmodium berghei* galur ANKA (pasase pertama) secara intraperitoneal sebesar 1×10^6 /ml. Derajat parasitemia mencit donor yang akan ditransfer ke mencit perlakuan terlebih

dahulu dihitung dari sediaan hapusan darah tipis yang diambil dari ujung ekor dan kemudian dipulas dengan pewarna Giemsa. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop pembesaran 1000x. Untuk menghitung jumlah eritrosit darah diambil dari ujung ekor darah donor sebanyak 10 μ L dan dilakukan pengenceran 10^3 dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung Neubauer sehingga diketahui jumlah eritrosit/ml darah dengan rumus ($N \times 5 \times 10^4 \times \text{pengenceran}$), dengan N adalah jumlah eritrosit. Selanjutnya, jumlah parasit mencit donor dihitung dengan mengalikan jumlah eritrosit/ml darah dengan prosentase parasitemia. Jumlah parasit yang hendak diberikan sebesar 1×10^6 /ml darah, sehingga pengenceran yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah parasit tersebut adalah dengan membagi hasil perkalian jumlah eritrosit/ml darah dengan prosentase parasitemia dibagi 1×10^6 (Blazquez *et al.*, 2008). Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan M+ untuk mendapatkan konsentrasi parasit 10^6 dalam 0,2 mL darah, kemudian larutan tersebut dimasukkan secara intraperitoneal ke mencit perlakuan sebanyak 0,2 mL.

Inokulasi pada hewan coba dilakukan dengan menginjeksikan parasitemia mencit donor yang sudah diencerkan ke dalam peritoneum hewan coba. Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut, mencit dipegang pada bagian tengkuk, balikkan mencit sehingga bagian abdomennya tampak, dengan bagian kepala lebih rendah daripada badan. Bersihkan daerah yang akan disuntik dengan ethanol 70%. Jarum steril harus ditusukkan ke bagian kuadran kanan atau kiri bawah dari perut mencit, tusukkan jarum dengan kemiringan 30 derajat. Aspirasi memastikan penusukan yang benar dan suntikkan material (Gambar 4.1) (Supargiono, 1998).



Gambar 4.1. Lokasi dan Teknik Inokulasi *Plasmodium berghei* pada Hewan Coba

4.8 Prosedur Penelitian Tahap Dua

Pada tahap kedua ini yang dilakukan adalah pemeriksaan derajat parasitemia, ekspresi GLUT1 pada jaringan plasenta, serta gangguan perkembangan janin yang diukur melalui berat badan fetus menggunakan timbangan analitik (Mettler AE 50).

4.8.1 Pembuatan Hapusan Darah dan Pengecatan Giemsa

Sepuluh mikroliter darah dari ujung ekor mencit diteteskan pada gelas obyektif. Tetesan tersebut dibuat hapusan kemudian dikeringkan, selanjutnya diberi methanol absolut hingga merata dan ditunggu hingga kering, setelah itu hapusan dicat dengan giemsa yang merupakan campuran pulas giemsa dengan buffer giemsa dengan rasio 1:9 selama 30 menit. Kemudian dibilas dengan air kemudian dikeringkan.

4.8.2 Pengukuran Derajat Parasitemia

Derajat atau persentase parasitemia ditentukan dengan memeriksa hapusan darah dengan mikroskop pembesaran 1000x. Untuk penghitungan persentase parasitemia dihitung berdasarkan jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dalam 1000 eritrosit pada 20 lapang pandang.

4.8.3 Pembedahan Mencit

Pembedahan dilakukan pada hari ke-18 pasca kawin. Mencit dibius dengan kloroform yang telah dijenuhkan di dalam toples besar. Pembedahan dilakukan untuk mengambil plasenta dan fetus.

4.8.4 Isolasi Darah dan Jaringan Plasenta

Setelah hari ke 18 mencit dikorbankan untuk diambil darah dan organ plasenta untuk meneliti variabel. Pembedahan dilakukan dengan anestesi per inhalasi menggunakan kloroform. Mencit selanjutnya diletakkan di atas papan untuk dibedah. Pembedahan dilakukan dengan membuka kulit abdomen dan rongga abdomen. Janin dan plasenta disolasi kemudian ditimbang beratnya. Plasenta disimpan dalam botol organ dengan formalin 10%. Mencit yang sudah dikorbankan dan janin selanjutnya dikuburkan di dalam tanah.

4.8.5 Pembuatan Preparat Jaringan Plasenta

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin di Laboratorium Patologi RS. Dr. Soetomo Surabaya.

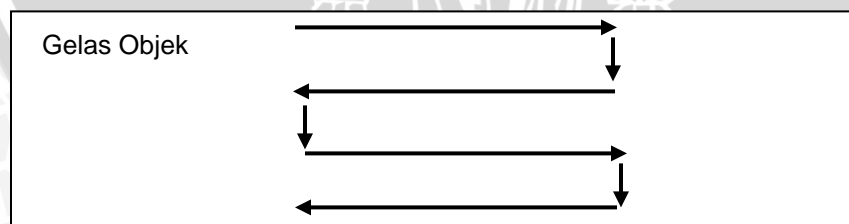
4.8.6 Pemeriksaan Ekspresi GLUT-1 di Jaringan Plasenta

Pemeriksaan ekspresi GLUT-1 dilakukan dengan metode imunohistokimia di Laboratorium Biomedik FKUB. Untuk pengecatan imunohistokimia pada slide dilakukan deparafinisasi dengan xylol 2x10 menit, ethanol absolute 1x5 menit, ethanol 90% 1x5 menit, ethanol 80% 1x5 menit, ethanol 70% 1x5 menit, aquades steril 3x5 menit. Slide selanjutnya dicuci dengan PBS steril 3x5 menit, dikeringkan dan ditetesi dengan H₂O₂ 3% dalam methanol dan diinkubasi 15–20 menit, kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Selanjutnya, dilakukan *antigen retrieval* (AR) pada slide menggunakan *Heat Induced Epitope Retrieval* (HIER) dengan pemanasan 95°C dalam *water bath* selama 20 menit dalam *buffer citrate* pH 0,6. Slide didinginkan secara perlahan. *Blocking* protein yang tidak spesifik dilakukan dengan meneteskan triton-x100 0.25% dalam *blocking buffer* BSA selama 1 jam suhu ruang dan dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Selanjutnya, slide ditetesi dengan antibodi primer (antibodi primer: FBS 5% = 1:100) dalam *blocking buffer* BSA dan diinkubasi satu malam dalam suhu 4°C. Keesokan harinya slide dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti-IgG rabbit anti-mouse* selama 60 menit suhu ruang, dan dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Setelah itu slide ditetesi dengan *Streptavidin Horeseradish Peroxidase* (SAHRP) (SAHRP dalam PBS steril 1:500), diinkubasi 40 menit suhu ruang, dicuci dengan

PBS steril 3x5 menit, dan dicuci dengan aquades steril 3x5 menit kemudian ditambahkan kromogen *Diaminobenzidine* (DAB) (1:50), diinkubasi 30 menit suhu ruang, dan dicuci PBS steril 3x5 menit. Terakhir slide dicounterstain dengan hematoksin mayer, diinkubasi 5–10 menit suhu ruang, dan dicuci dengan *tap water* steril 3x5 menit.

4.8.7 Pengamatan Imunohistokimia

Eksresi GLUT-1 dideteksi dari warna coklat yang mengitari seluruh permukaan membran sel trofoblas yang terakumulasi di jaringan plasenta. Preparat jaringan plasenta diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak imersi. Pengukuran ekspresi GLUT-1 diamati pada 20 lapang pandang mikroskop, karena diasumsikan terdapat 1000 sel yang terdapat dalam 20 lapang pandang (Soini *et al.*, 1998), kemudian diambil rata-rata dari total ekspresi GLUT-1 untuk tiap-tiap sampel. Area penghitungan dimulai dari bagian kiri atas berlanjut hingga ujung tepi kanan dilanjutkan dengan area di bawahnya dan seterusnya sesuai gambar berikut ini.



Gambar 4.2. Cara Mengukur Ekspresi GLUT-1 di Area Penghitungan

4.8.8 Pemeriksaan Berat Badan Janin Mencit

Gangguan pertumbuhan janin diukur melalui berat badan janin menggunakan timbangan analitik. Penimbangan berat badan janin mencit dilakukan setelah parturisi yaitu pada hari ke delapan belas setelah perkawinan. Janin di pisahkan dengan plasenta dan dibersihkan selaput lendirnya, selanjutnya di timbang satu persatu dengan menggunakan neraca analitik Mettler AE 50 dengan satuan ukuran gram.

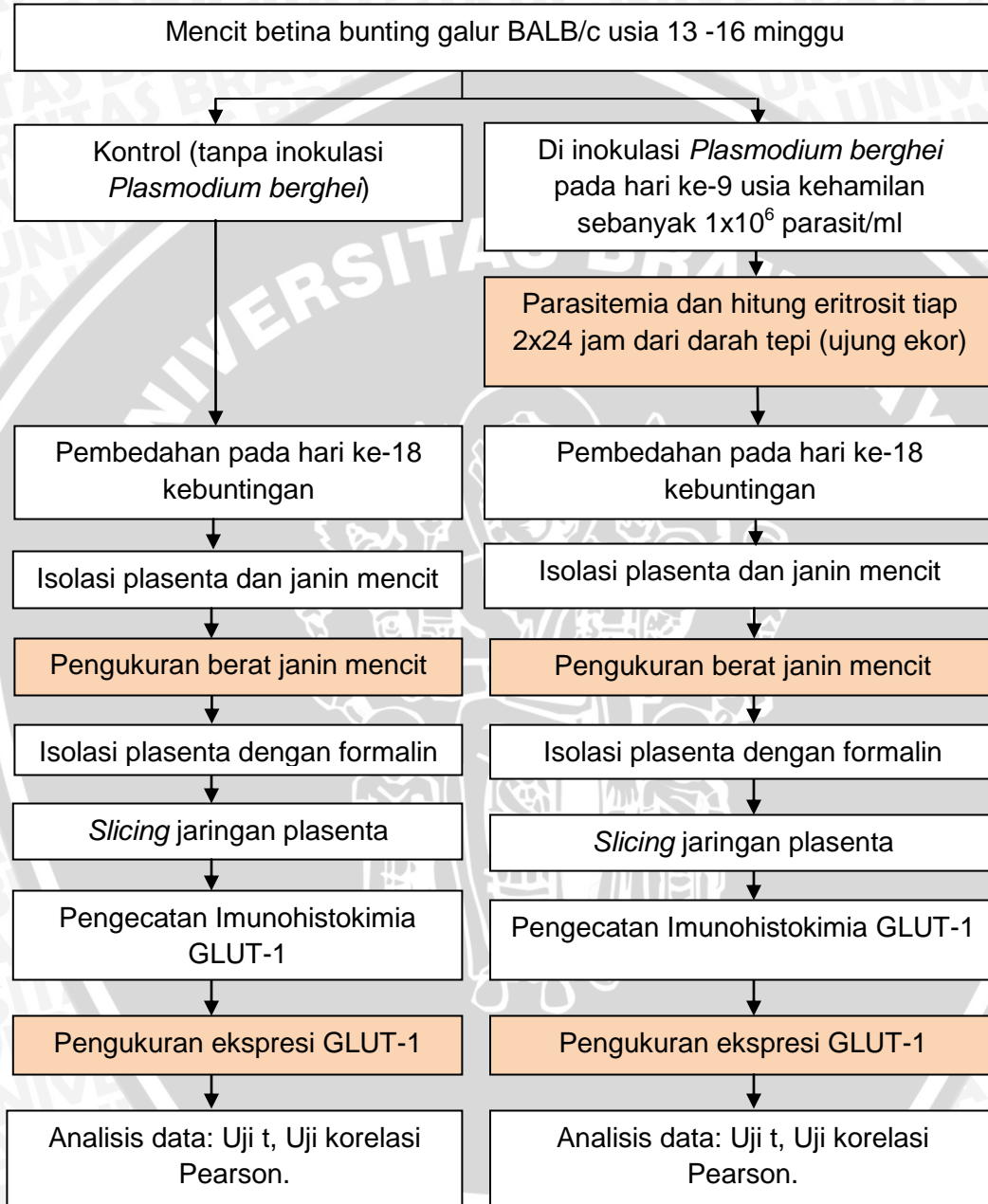
4.9 Analisis Data

Data yang diambil berupa ekspresi GLUT-1 jaringan plasenta dan berat badan janin mencit pada kelompok mencit bunting kelompok kontrol dan mencit bunting kelompok perlakuan. Perbedaan variabel antara dua kelompok dianalisis dengan uji beda *t*. Hubungan antara variabel dependent dianalisis dengan uji korelasi *Pearson* dengan $\alpha < 0,05$. Analisis data dilakukan dengan SPSS 16.

4.10 Etika Penelitian

Penelitian ini sudah mendapat *ethical clearance* dari Tim Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan nomor 104/ EC/ KEPK-S2/ 03/ 2013.

4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian