

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* pada hewan mencit galur balb/c dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Identifikasi dan Batasan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c. Pemakaian mencit sebagai hewan coba didasarkan pada beberapa alasan, diantaranya mencit adalah hewan coba yang mudah ditangani, mudah dipelihara, dan mudah dikembangbiakkan. Sedangkan pemilihan galur Balb/c karena galur ini adalah model yang baik dalam memperagakan status umum terhadap malaria, khususnya malaria transplasental (Kane *et al.*, 2011).

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi mencit yang digunakan sebagai model adalah sebagai berikut: mencit balb/c betina primigravida, dewasa umur 13-16 minggu, berat badan mencit antara 20-30 gram dan tidak cacat fisik, sedangkan kriteria eksklusi pengambilan sampel mencit yaitu mencit betina tidak bunting dan multigravida.

4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada hewan coba adalah dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol dan perlakuan. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua kelompok :

- Kelompok kontrol : Kelompok mencit bunting tanpa diinokulasi *Plasmodium berghei*.
- Kelompok perlakuan : Kelompok mencit bunting dengan diinokulasi *Plasmodium berghei*.

4.2.4 Jumlah Sampel

Besaran sampel untuk penelitian eksperimental murni (*true experimental*) di laboratorium:

$$\{(np-1) - (p-1)\} \geq 16$$

$$\{(2n-1) - (2-1)\} \geq 16$$

$$2n - 1 \geq 17$$

$$2n \geq 18$$

$$n \geq 9$$

Keterangan:

n : ukuran sampel

p : banyaknya perlakuan

Dari rumus tersebut diperoleh ukuran sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok adalah 10, sehingga mencit yang diperlukan untuk penelitian ini berjumlah 20 ekor. Keberhasilan kebuntingan 40%, maka dibutuhkan 50 mencit betina dan 50 mencit jantan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jumlah dan waktu inokulasi *Plasmodium berghei* pada mencit kelompok perlakuan.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi limfosit T CD4 dan berat badan fetus mencit.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

Jenis mencit

Umur mencit

Usia kehamilan mencit

Primigravida

Jenis kelamin mencit

Kondisi lingkungan kandang

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2012 sampai dengan bulan Mei 2013.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Usia Kebuntingan Mencit

Usia kebuntingan mencit dihitung mulai dari waktu mencit dikawinkan sampai mencit dimatikan pada hari ke-18 setelah pengawinan.

4.5.2 Lama Waktu Infeksi

Waktu awal mencit diinokulasi *P. berghei* yaitu hari ke-9 kebuntingan sampai dengan mencit dimatikan pada hari ke-18 kebuntingan.

4.5.3 Infeksi *Plasmodium Berghei*

Plasmodium berghei adalah Plasmodium yang menginfeksi mencit, pada manusia memberi gejala yang sama dengan *P falciparum*. *Plasmodium berghei* galur Anka ini di dapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya. Plasmodium ini diinfeksi pada mencit galur Balb/c dengan konsentrasi parasit 106 dalam 0,2 mL darah secara intraperitoneal.

4.5.4 Derajat Parasitemia

Persentase jumlah parasit yang ditentukan diantara 1000 eritrosit pada sediaan tetes tipis.

4.5.5 Ekspresi Limfosit T CD4

Ekspresi limfosit T CD4 merupakan marker dari limfosit T helper. Sel limfosit dapat kita ketahui dari inti bulat, agranul dengan sitoplasma basofilik sempit. Ekspresi CD4 ini diukur dengan cara imunohistokimia, dimana pada sitoplasma limfosit akan tercatat coklat dengan antibodi monoklonal CD4 mouse dari Santa cruz, nomer katalog sc-59031 CD4 (10C12) bila limfosit positif mengekspresikan CD4.

4.5.6 *Intra Uterine Growth Retardation (IUGR)*

Intra Uterine Growth Retardation adalah salah satu efek malaria transplasental pada janin ditandai dengan berat badan janin yang rendah. Deteksi IUGR pada janin dilakukan dengan cara menimbang berat badan janin. Janin dikatakan memiliki berat badan yang tidak normal jika berada di bawah berat badan janin pada kelompok kontrol.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perawatan Mencit

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, makanan mencit, sekam, timbangan berat badan dengan neraca.

2. Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

Alat : Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan.

Bahan : Diet normal chow (5012, Purina, Richmond, IN) yang mengandung 4% lemak atau confeed PAR-S, tepung terigu protein tinggi dan air sebagai diet standar.

3. Inokulasi *Plasmodium berghei*

Alat : *Eppendorf*, tabung *falcon* 15 ml, mikropipet, mikroskop, pinset gunting steril, hemositometer, spuit insulin 1 ml, *object glass*, tabung gelas ukur, dan pipet kaca.

Bahan : *Plasmodium berghei* dari darah mencit terinfeksi larutan PBS, larutan M⁺, EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*), Larutan Giemsa, kapas alkohol, methanol p.a., Buffer Giemsa.

4. Pengukuran Derajat Parasitemia

Alat : Gelas obyek, tabung *falcon*, gunting steril, mikroskop, pipet, kapas

Bahan : Alkohol, buffer Giemsa dan larutan Giemsa, methanol p.a., minyak emersi.

5. Pembedahan Mencit

Alat : Gunting bedah, scalpel, steroform 2 atau plastik tempat jaringan, pinset 2, kapas atau kasa, jarum pentul 2 set.

Bahan : Kloroform 20 ml, spuit insulin 1 ml 30 buah, formalin 10% 200 ml, *aquabidest*, wadah plastic+tutup 25 buah, alcohol, vacuotainer 25 buah.

6. Penimbangan Bayi Mencit

Menimbang bayi mencit menggunakan neraca analitik Mettler AE50.

7. Pembuatan Spesimen Histopatologi

Alat : *Auto-tehnicon*, inkubator, *hot plate*, *water bath*, mikrotom, *object glass*, *cover glass*.

Bahan : Xylol, alcohol, parafin, entelan dan pewarna hematoksilin eosin.

8. Deparafinisasi

Alat : *Decloaking chamber*, kapas, wadah plastik, pipet tetes, tabung ukur, pinset, dan tabung reaksi.

Bahan : Xylol 1, xylol 2, xylol 3, etanol, alcohol 90%, alcohol 80%, H₂O₂, metanol, aquades, larutan diva, dan larutan *universal decloaker*.

9. Pewarnaan Immunohistokimia

Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (moab) anti CD4+*, *Kit universal streptavidin-biotin*, pensil paraffin *waterbath* tempat pewarnaan dan cucian Mikropipet 100µl ,1-10 µl ; 40-200 µl ; 200-100 µl. *White tip*, *yellow tip*, *blue tip*. Kertas saring *Freezer*, *Timer*, Tabung plastik dan pipet.

10. Perhitungan Ekspresi Limfosit T CD4

Mikroskop dan alat hitung cepat

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c yang didapat dari Universitas Gajah Mada. Penelitian ini menggunakan 100 mencit yang terdiri dari 50 mencit betina dan 50 mencit jantan. Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahap, yaitu masa persiapan pemeliharaan, masa perlakuan, dan masa pengamatan jaringan plasenta. Mencit yang baru datang di pisah antara jantan dan betina dan diberi label setiap kandangnya. Lalu mencit diistirahatkan dalam kandang untuk beradaptasi selama 5 hari. Selama pemeliharaan, mencit diberi makan dan minum yang sesuai setiap hari. Untuk meningkatkan kesuburan mencit, maka makanan ditambahkan kecambah. Sebelumnya, mencit betina ditimbang terlebih dahulu berat badannya.

Pemisahan mencit jantan dan betina bertujuan untuk Sinkronisasi estrus secara alami, yaitu dilakukan dengan memanfaatkan fenomena alam. Mencit-mencit yang dikelompokkan sesama betina dalam kurun waktu lama (lebih dari 2 siklus estrus), akan cenderung untuk tidak mengikuti siklus birahi (*anestrus*), terhenti pada fase diestrus, atau mengalami kebuntingan palsu (*pseudopregnancy*). Keadaan ini disebut *Lee-Boot effect*. Mencit betina yang telah dipisahkan dari pejantan baik secara individual ataupun berkelompok tersebut akan memulai siklus birahnya yang sebelumnya terhenti, bila dipapar dengan bau-bauan yang berasal dari pejantan, misalnya urine atau sekam yang mengandung urine pejantan. Keadaan ini disebut *pheromone effect*. Dengan cara ini biasanya mencit betina akan mengalami birahi pada malam ke tiga (72 jam) setelah pemaparan. Fenomena ini disebut *Whitten effect*. Setelah itu, mencit dikawinkan, mencit jantan dicampur dengan mencit betina (1:1). mencit

dimasukkan pukul 4 sore dan dipisah kembali keesokan paginya. Bila ditemukan sumbat vagina, maka mencit telah mengalami kopulasi dan masa kehamilan ke nol. Kemudian ditimbang berat badan mencit betina setiap hari untuk melihat kebuntingannya. Persentasi kehamilan 40%, maka kemungkinan mencit bunting adalah 20 ekor yang kemudian akan dipisah menjadi kelompok perlakuan dengan induksi *plasmodium berghei* dan kelompok kontrol yang tidak diinduksi *plasmodium berghei*.

4.7.2 Inokulasi *Plasmodium Berghei*

Inokulasi dilakukan dengan menginokulasikan *P.berghei* galur ANKA secara intraperitoneal. Setelah inokulasi, dilakukan penghitungan parasitemi. Parasitemia dihitung dua hari setelah diinokulasi dan 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 parasitemi mencit donor diatas 15%, berarti mencit donor tersebut telah siap digunakan sebagai donor infeksi mencit perlakuan. Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis yang telah dipulas dengan pewarna *Giemsa*. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit dengan mikroskop pembesaran 1000 x.

Dengan mengalikan jumlah eritrosit per mL darah dengan parasitemia, didapatkan jumlah parasit per mL darah. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan M⁺ untuk mendapatkan konsentrasi parasit 10⁶ dalam 0,2 mL darah, kemudian larutan tersebut ditransfer secara intraperitoneal ke mencit perlakuan sebanyak 0,2 mL.

4.7.3 Pengukuran Parasitemia

Pengambilan darah untuk pengukuran parasitemia dilakukan setiap hari dengan membuat hapusan darah dari ekor mencit kemudian diteteskan pada

object glass. Tetesan tersebut dibuat hapusan tipis kemudian dikeringkan, selanjutnya diberi methanol hingga merata dan ditunggu hingga kering, setelah itu hapusan dicat dengan giemsa yang merupakan campuran pulas giemsa dan buffer giemsa dengan rasio 1:9 (10%). Pengecatan ini didiamkan selama 45 menit. Kemudian dibilas dengan air kemudian dikeringkan. Derajat parasitemia dilihat dengan memeriksa hapusan darah dengan mikroskop pembesaran 100x. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit (Abdullah, 2006)

4.7.4 Pembedahan Mencit

Pembedahan mencit dilakukan pada hari ke 18. dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup mencit yang sudah diberi anestesi diletakan di atas steroform, difiksasi, lalu dibedah. Darah diambil terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, plasenta dan fetus mencit diambil serta difiksasi ke dalam formalin 10%.

4.7.5 Penimbangan Fetus Mencit

Berat badan fetus mencit dapat diukur secara langsung dengan menggunakan neraca analitik Mettler AE50.

4.7.6 Pembuatan Spesimen Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya. Secara umum, terdapat 10 langkah dalam tahapan pembuatan preparat rutin yaitu pengawetan, dehidrasi (pengeluaran air dari dalam sel/organ), pembersihan (*clearing*), pembenaman (*embedding*), pencetakan (*blocking*), pengirisan blok jaringan (*sectioning*), penempelan irisan pada kaca objek, pewarnaan (*staining*),

penutupan preparat dengan kaca penutup (*mounting*), dan pelabelan preparat (*labeling*).

Pengawetan (*fixation*) dilakukan untuk mempertahankan struktur sel dan jaringan sedapat mungkin mendekati keadaan aslinya (saat masih hidup). Sebagian besar dari larutan pengawet bekerja untuk mempertahankan protein. Dengan demikian, tidak ada satu pun jenis larutan pengawet yang dapat melakukan pengawetan secara sempurna dalam mencapai tujuan pengawetan. Larutan yang biasa digunakan adalah larutan formalin 10%.

Karena sebagian besar volume sel terdiri dari air dan air memberikan konsistensi lunak pada jaringan sehingga keberadaan air dalam sel akan menyulitkan pengirisan jaringan. Untuk itu, air dalam jaringan/sel harus dikeluarkan dari sel dengan menggunakan dehidran yaitu alkohol 96%. Selain menarik air dari dalam jaringan dan sel, penggunaan alkohol akan mengakibatkan larutnya komponen lemak dari sel.

Untuk dapat diiris dengan mikrotom, jaringan harus menjadi cukup keras. Secara rutin, parafin digunakan mengisi bagian sel yang telah ditinggalkan oleh air. Namun, parafin tidak dapat menyusup ke dalam sel tanpa bantuan zat yang disebut sebagai bahan penjernih (*clearing agent*). Bahan penjernih yang rutin digunakan adalah xylol. Setelah mencapai tahap jernih, jaringan akan direndam dalam parafin cair bersuhu 55 °C selama 3 jam di dalam inkubator. Diperkirakan selama waktu tersebut, parafin yang dapat bercampur dengan xylol akan menggantikan xylol di dalam jaringan.

Langkah selanjutnya adalah melakukan pencetakan dengan cetakan parafin. Sampel organ plasenta dikeluarkan dari inkubator dan diberi tambahan

parafin cair. Saat parafin mengeras, kita telah mendapatkan blok parafin berisi sampel plasenta.

Pengirisan sampel dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan yang diinginkan. Variasi ketebalan disesuaikan dengan tujuan pembuatan preparat. Untuk penggunaan rutin, ketebalan yang sesuai adalah 5 μm . Setelah dilekatkan pada kaca benda (*object glass*), irisan dapat diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entelan dan ditutup menggunakan *cover glass*.

4.7.7 Deparafinisasi

Sebelum dilakukan pewarnaan imunohistokimia, preparat yang telah diparafin dilakukan proses deparafinisasi. Deparafinisasi adalah proses penghilangan parafin menggunakan xylol. Deparafinisasi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya dengan metode Antigen Retrieval.

Langkah pertama deparafinisasi dengan metode Antigen Retrieval adalah preparat jaringan dimasukkan ke dalam xylol 1, xylol 2, dan xylol 3 masing-masing selama 3 menit. Kemudian rehidrasi dengan alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah yaitu etanol, alkohol 90%, dan alkohol 80% masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya cuci dengan air mengalir dan celupkan ke dalam akuades selama 3 hingga 5 menit. Preparat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 95ml larutan campuran H_2O_2 , metanol, dan aquades selama 20 menit. Larutan campuran tersebut terdiri dari 5 ml metanol dan 1,6 ml H_2O_2 sebanyak 1600 mikron. Selanjutnya bilas preparat menggunakan air selama 3 hingga 5 menit. Preparat tersebut dimasukkan ke dalam larutan diva. Larutan diva tersebut terdiri dari aquades dan larutan *universal decloaker* dengan perbandingan 180 ml

: 20 ml. Kemudian preparat bersama larutan diva dimasukkan ke dalam alat *decloaking chamber* selama 45 menit dan pada pengaturan suhu diatur menjadi 95°. Tutup alat *decloaking chamber* baru dapat dibuka bila suhu sudah turun secara otomatis mencapai dibawah 90°.

4.7.8 Pewarnaan Immunohistokimia CD4 pada Jaringan Plasenta.

Pemeriksaan CD4 dilakukan dengan metode imunohistokimia di Laboratorium Biomedik FKUB. Untuk pengecatan imunohistokimia pada preparat 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) 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 (Bovine Serum Albumin) selama 1 jam suhu ruang dan dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Selanjutnya, slide ditetesi dengan antibodi primer (anti bodi primer:FBS 5% = 1:100) dalam *blocking buffer* BSA, 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-horseradish peroxidase* (SA-HRP) (SA-HRP 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

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.

4.7.9 Perhitungan Ekspresi CD4

Ekspresi limfosit T CD4 dinilai dengan skor histologi merupakan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi anti sel T CD4 dan pewarnaan metode *streptavidin-biotin* pada preparat jaringan plasenta. Kita dapat mengamati warna merah kecoklatan pada daerah sitoplasma limfosit. Masing masing sediaan diteliti sebanyak dua puluh lapang pandang dan perbesaran 1000x dengan minyak emersi. Nilai ekspresi limfosit T CD4 akan dinyatakan dalam rerata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan CD4 perlapangan pandang besar.

4.8 Pengumpulan dan Analisa Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Setelah diinokulasi *Plasmodium berghei*, setiap hari dilakukan perhitungan persentasi parasitemia pada mencit.
- b. Setelah pembedahan mencit dilakukan evaluasi hasil dari imunohistokimia dengan menggunakan antibodi CD4 serta mencatat hasil dari evaluasi.
- c. Preparat yang telah tercatat diamati secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x menggunakan *oil immersion* dan dihitung jumlah limfosit T yang memiliki marker CD4.

4.8.2 Analisa Data

Data hasil penelitian dianalisis dengan bantuan perhitungan program SPSS 16,0 for Windows XP dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Adapun teknik analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

4.8.2.1 Uji T Beda Dua Sampel Bebas (*Independent T Test*)

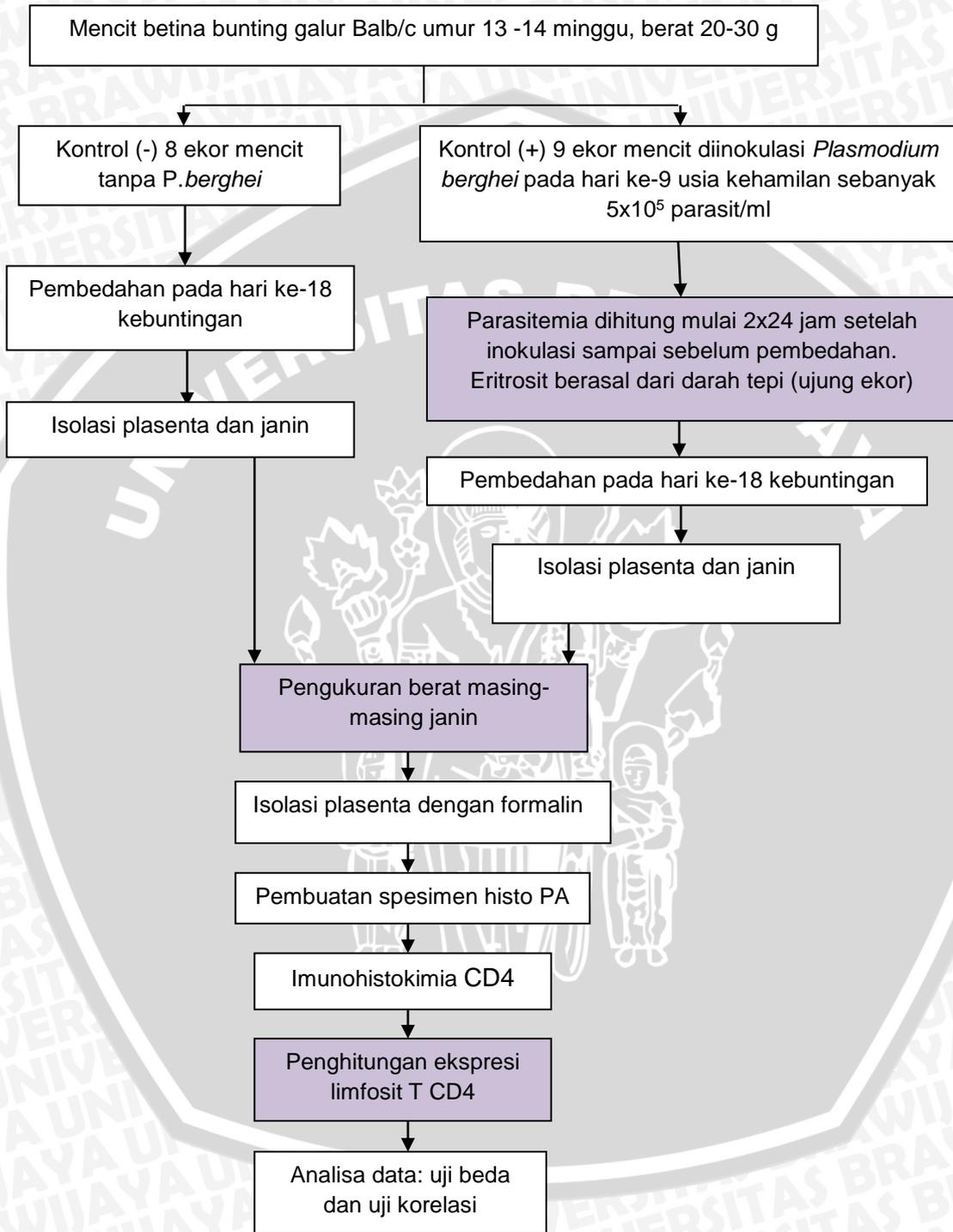
Teknik ini digunakan untuk membandingkan dua nilai mean variabel tergantung antara :

- a. Ekspresi limfosit T CD4 pada jaringan plasenta mencit kelompok perlakuan dengan mencit kelompok control.
- b. Berat badan fetus mencit kelompok perlakuan dengan berat badan fetus mencit kelompok control.

4.8.2.2 Uji korelasi

Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi pearson. Tekhnik ini digunakan untuk mengetahui apakah ada korelasi antara ekspresi limfosit T CD4 dengan rendahnya berat badan janin.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.9 Alur Penelitian