

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan secara *in vivo* pada mencit.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan dalam waktu lima bulan.

4.3 Subyek Penelitian

Penelitian secara *in vivo* dengan hewan coba dalam penelitian ini menggunakan mencit galur Balb/c jantan. Kriteria mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah termasuk galur Balb/c berjenis kelamin jantan yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 20 – 30 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif dan belum menerima asupan bahan kimia/xenobiotik dengan cara apapun yang didapat dari Unit Pengembangan Hewan Coba Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pemakaian mencit sebagai hewan coba yang mudah ditangani, mudah dipelihara, dan memiliki respon imun yang mirip dengan manusia.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian dibagi dalam beberapa kelompok sebagai berikut :

- a. Kontrol positif : Mencit yang diinokulasi *P.berghei* saja
- b. Kelompok A : Mencit yang diberikan antigen proteasom 20s 1 μ L
kemudian diinokulasi *P.berghei*
- c. Kelompok B : Mencit yang diberikan antigen proteasom 20s 2 μ L
kemudian diinokulasi *P.berghei*
- d. Kelompok C : Mencit yang diberikan antigen proteasom 20s 4 μ L
kemudian diinokulasi *P.berghei*
- e. Kelompok D : Mencit yang diberikan antigen proteasom 20s 8 μ L
kemudian diinokulasi *P.berghei*
- f. Kontrol negatif : Mencit sehat yang tidak diberi perlakuan.

Jumlah pengulangan eksperimen yang dilakukan berdasarkan penghitungan rumus:

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

Keterangan:

P: Banyak kelompok perlakuan

n: Jumlah replikasi (pengulangan)

Berdasarkan rumus diatas perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah:

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

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n - 4 \geq 16$$

$$5n \geq 20$$

$n \geq 4$ (Tjokronegoro, 2004)

Jadi berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis antigen proteasom 20s dengan 4 dosis berbeda ditambah 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif.

4.5.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah derajat parasitemia

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Mencit Balb/c merupakan mencit jantan galur Balb/c yang dibeli dari Unit Pengembangan Hewan Coba Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Mencit berumur 8 – 12 minggu, berat 20 – 30 gram.
2. *Plasmodium berghei* merupakan *Plasmodium berghei* yang didapat dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dibiakkan pada mencit Balb/c di Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. *Antigen proteasom* merupakan isolasi antigen dari hasil lysat *Plasmodium berghei*.
4. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA

digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

5. *Antibodi Proteasom 20s* merupakan Antibodi spesifik dari induksi *Antigen proteasom 20s* pada mencit.
6. Infeksi *Plasmodium berghei* pada hewan coba dilakukan setelah terbukti adanya pembentukan *Antibodi Proteasom 20s*. Infeksi dilakukan secara intraperitoneal dengan parasit sebanyak $1 \times 10^7 / 0,2$ cc darah.
7. Derajat parasitemia adalah presentasi eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam 1000 eritrosit (dihitung dengan *hand counter*) pada hapusan darah tipis (*thin smear*) yang dipulas dengan *Giemsa staining*.

4.7 Instrumen Pelaksanaan

4.7.1 *Thawing* dan Kultur Biakan *Plasmodium berghei* pada mencit

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah *Laminar air Flow*, Flask Kultur, *Disposable micro pipet* 5ml, falcon 15 ml, falcon 50 ml, sentrifuse, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640, serum manusia tipe O 10%, 5% hematokrit, NaCl (Natrium Klorida) 12% dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS), 0,9% NaCl dalam PBS, 0,2% glukosa dalam PBS.

4.7.2 Isolasi proteasom 20s

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah pipet, heparin, saponin 0,15%, PBS, 20mM *N-ethylmaleimide* (NEM), 0,05mM *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), 1mM *4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride* (AEBSF), 0,02% Natrium Azidatan Protease Inhibitor Cocktail, dan pelet parasit

4.7.3 Inokulasi protesom 20s

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah spuit insulin 1 ml, PBS, CFA dan IFA.

4.7.4 Pembuatan Hapusan Parasit

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah Gelas obyek, micro pipet, mikroskop Giemsa, buffer giemsa, methanol, dan minyak emersi.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba sebanyak 24 ekor mencit Balb/c jantan dibeli dari Unit Pelayanan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada dan dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Mencit dipelihara dalam kandang berukuran 30x30 cm. Kandang untuk mencit dengan dosis perlakuan berisi 4 mencit tiap satu kandang, sementara mencit kontrol positif dan negatif masing-masing berisi 1 ekor mencit dengan total ada 6 kandang. Mencit diadaptasi selama 1 minggu sebagai penyesuaian dengan lingkungan. Makanan dan minuman diberikans ekali setiap harinya.

4.8.2 Thawing *Plasmodium berghei*

Isolat parasit diambil dari *liquid Nitrogen Tank*. Kemudian, ditambahkan NaCl 12% sebanyak 1/5 volume dengan pipet. Ditambahkan NaCl 1.6% sebanyak 9x volume dengan pipet, kemudian ditunggu hingga 5 menit. Disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang, ditambahkan campuran NaCl 0.9%, dan glukosa 0.2% sebanyak 9x volume tetes demi tetes dengan pipet. ditunggu 5 menit kembali. Disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang, ditambahkan CM (*Complete*

media) 15% sebanyak 6 ml, dan dimasukkan dalam *flask culture*. Semua pekerjaan yang berhubungan dengan isolat *P. berghei* dilakukan dengan *laminar air flow* dan bersifat aseptik (Blazquez *et al*, 2008).

4.8.3 Inokulasi *Plasmodium berghei* pada Mencit

Inokulasi dilaksanakan secara *intraperitoneal* (i.p.) dengan jumlah sebanyak 10^7 parasit dalam 0.2 ml darah untuk mencit. Jumlah eritrosit per ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransferkan parasitnya terlebih dahulu dihitung. Darah yang terinfeksi diambil sebanyak 10 μ L dan dilakukan pengenceran $10^4 \times$ dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung *eri Naubauer* 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 parasit dengan parasitemia. Jumlah parasit yang hendak diberikan sebesar 10^7 dalam 0.2 ml darah sama artinya dengan memberikan 5×10^7 parasit dalam 1 ml darah, sehinggapengenceran yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah parasit tersebut adalah : jumlah parasit / 5×10^7 (Blazquez *et al*, 2008).

4.8.4 Isolasi *Plasmodium berghei* dari mencit

Mencit Balb/c yang telah terinfeksi *Plasmodium berghei* dikorbankan dengan dibedah dan darah berparasit dikoleksi dari jantung mencit menggunakan spuit yang telah dicuci dengan heparin. Leukosit dari darah mencit dihilangkan dengan membuang supernatant hasil sentrifugasi differensial dengan gradient 'Hypaque'-'Ficoll'. Lalu kemudian untuk endapan eritrosit tersebut dicuci sekali lagi dengan lisis saponin 0,15% 100ul. Pencucian selanjutnya dilakukan dalam 100ul PBS dilengkapi dengan 20mM NEM, 0,05mM EDTA, 1mM AEBSF, 0,02% Natrium

Azida dan Protease Inhibitor Cocktail dan disentrifus 6000rpm. Pelet parasit disimpan dalam suhu -80°C untuk digunakan pada tahap isolasi protein (sebaiknya supernatant jangan dibuang karena mungkin parasite sudah terisolasi proteinnya dengan bahan *washing* di atas, dapat dites dengan elektroforesis).

4.8.5 Isolasi Proteasom 20s dari *Plasmodium berghei*

Protein diekstraksi dari pellet parasite melalui sonikasi dalam buffer lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM AEBSF, 20 mM NEM, 0,5 mM EDTA, 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail, 0,02% Na Azida). Sentrifugasi 6000 rpm 15 menit. Supernatan yang berisi protein diambil untuk pemeriksaan profil protein Plasmodium (bisa sampai tahap ini selesai) atau supernatant disentrifugasi lagi 15.000 rpm 15 menit untuk mendapatkan proteinnya pada pelet. Dalam penelitian yang dilakukan sebelumnya menunjukkan ada sebuah gen novel kloning dari *Plasmodium falciparum* yang merupakan turunan dari 20S Proteasom β subunit dalam perbandingan urutan DNA genom gen dengan urutan cDNA mengungkapkan 156-bp intron 85 bp hilir dari kodon start. Urutan nukleotida gen berisi satu kerangka encoding 265 asam amino dengan masa molekul 30,9 kDa (Gao De-Li *et al*, 2000) dan telah diteliti bahwa genom dari *Plasmodium berghei* identic dengan *Plasmodium falciparum* (Nurhayati, 2011). Hasil dari SDS PAGE menggunakan marker Proteasom SIGMA, pada SDS PAGE pada letak pita yang sejajar, dipotong secara mekanik yang kemudian GEL SDS PAGE yang telah dipotong pada pita dengan berat molekul tertentu kemudian dielusi dan diselofan running dengan arus listrik dalam larutan buffer selama satu malam. Kemudian di berikan aseton untuk memekatkan protein dan selanjutnya dibiarkan semalam, setelah dibiarkan semalam kemudian dilakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 15

menit, supernatan di pisahkan dengan endapan, supernatan dibuang dan endapan disimpan pada suhu 4°C hingga aseton benar-benar habis.

4.8.6 Inokulasi Proteasom 20s pada Mencit

Protein Proteasom yang telah diisolasi dilarutkan PBS sebanyak 1000µg/mL campurkan dalam suspensi cair dengan *Freund's Complete Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 menggunakan vortex. Protein + CFA diinjeksikan intraperitoneal, Imunisasi pertama kali, dan dilanjutkan dengan pemberian Proteasom + *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) diinjeksi subkutan. Pemberian Protein + Adjuvan dilakukan selama 8 minggu.

4.9 Kelengkapan Administratif

4.9.1 Hewan coba

Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat kelayakan etika (*ethical clearence*) FKUB.

4.9.2 Penggunaan Laboratorium

Penggunaan laboratorium telah mendapatkan izin dan diketahui oleh kepala laboratorium dari masing-masing laboratorium yang digunakan (Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik FKUB).

4.10 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik dan laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 Bulan.

4.11 Rancangan Penelitian

