

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian *post test only control group*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian selama 6 bulan yaitu bulan Mei- Oktober 2014.

4.3 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan parasit *Plasmodium berghei* didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan uji yang dipakai adalah mencit galur C57BL/6J berjenis kelamin betina yang diperoleh dari Institut Eijkman Jakarta. Hewan uji dalam penelitian ini dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Teknik Sampling

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian diambil secara *Purposive Sampling*, dengan restriksi sebagai berikut:

1. Jenis mencit : mencit galur C57BL/6J
2. Umur mencit : 6-8 minggu
3. Berat badan mencit : 20-40 gram
4. Jenis kelamin mencit : betina

4.5 Estimasi Jumlah Sampel

Karena dalam penelitian ini terdapat 6 jenis perlakuan, maka jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Solimun, 2001). Dari rumus tersebut, jika jumlah perlakuan adalah 6, maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah sebanyak 3, yang diperoleh dari penghitungan sebagai berikut:

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

$$[(6n-1) - (6-1)] \geq 16$$

$$(6n-1)-6 \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 3$$

4.6. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infeksi *Plasmodium berghei* dan pemberian ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa*) dan artesunat dalam variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah derajat parasitemia dalam serum dan gambaran imunohistokimia jaringan hepar

Variabel perancu (*confounding factors*) pada penelitian ini meliputi:

a. Dapat dikendalikan :

- 1) Spesies mencit
- 2) Umur mencit
- 3) Suhu ruangan

- 4) Infeksi sekunder
 - 5) Stres mencit
 - 6) Ketelitian pengamatan
- b. Tidak dapat dikendalikan :
- 1) Variasi genetic

4.7. Definisi Operasional

1. Artesunat : merupakan antimalaria derivat artemisin dalam sediaan ampul
2. Dosis artesunat : pemberian artesunat dengan dosis 32 mg/kgBB/hari secara intramuskuler.
3. Ekstrak metanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) adalah hasil ekstraksi serbuk (simplisia) batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) menggunakan pelarut methanol. Serbuk (simplisia) batang brotowali diambil dari Materia Medika Kota Batu, sedangkan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium LIPI Bandung.
4. *Plasmodium berghei* yang digunakan adalah *Plasmodium berghei* ANKA yang didapat dari Institut Eijkman Jakarta.
5. Derajat Parasitemia adalah jumlah parasit malaria bentuk aseksual yang menginfeksi eritrosit dibandingkan dengan seluruh eritrosit yang diamati (1000 eritrosit), untuk menghitungnya menggunakan rumus;

$$\% \text{ Eritrosit Terinfeksi} = \frac{\sum \text{eritrosit terinfeksi}}{\text{eritrosit yang dihitung}} \times 100$$

Pada hapusan darah tipis yang dipulas dengan Giemsa dan diamati dengan pembesaran 1000x.

6. Perkembangan Plasmodium yaitu tahap perkembangan aseksual *Plasmodium falciparum* dalam eritrosit yang meliputi tahap *schizont*, *ring stage* dan *throzoit*.
7. Dosis ekstrak batang brotowali : pemberian suplementasi ekstrak metanol batang brotowali 50 mg/hari, 60 mg/hari, 70 mg/hari, per hari berdasarkan literatur penelitian sebelumnya dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde.
8. Lama waktu infeksi : waktu mulai mencit diinfeksi *P. berghei* sampai mencit dimatikan yaitu pada hari ke-14
9. Lama pemberian dosis : waktu mulai derajat parasitemia mencit mencapai $\pm 15\%$ (6 hari setelah inokulasi *P. berghei*) sampai selesai perlakuan (hari ke-14).
10. Inokulasi *Plasmodium berghei* : Mencit galur C57BL/6J diinokulasi dengan 5×10^5 sel darah merah *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal pada semua kelompok mencit.
11. Imunohistologi hepar : Preparat hepar dibuat parafin blok di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, diperiksa dengan metode imunohistokimia di Laboratorium Biomedik FKUB dengan antibodi monoklonal terhadap HSP70 katalog/ size: 648001/25 μ g, 648002/100 μ g dari BioLegend. HSP70 akan terwarnai sebagai warna kecoklatan pada sitoplasma dengan pemeriksaan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Dilakukan sendiri didampingi dengan pengamat dari Laboratorium Biomedik FKUB.

4.8. Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat Penelitian

Alat-alat diperlukan untuk pemeliharaan mencit dan perlakuan adalah kandang mencit, tempat minum, tabung eppendorf, mikropipet, pinset, hemositometer, gelas objek, tabung flacon, gunting steril, mikroskop, spuit, tabung gelas ukur, timbangan, mortal, pengaduk, sonde lambung mencit, mikroskop, scalpel, pinset, kasa, tempat plastik jaringan.

Alat-alat yang digunakan untuk membuat sediaan histopatologi dan pengecatan imunohistokimia adalah gelas objek, heater, mikrotom, pipet, bak pengecatan, refrigenerator 2-8°C, cover glass, mikroskop.

4.8.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan mencit dan perlakuan adalah *P. berghei*, *Phosphat buffer solution* (PBS), larutan M⁺, EDTA, methanol PA, giemsa, aquades, artemether, ekstrak batang brotowali, carboxymethyl sellulose (CMC), minyak emersi, alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 85%, alkohol 70%, alkohol asam, formalin 10%, xylol, paraffin, gliserin, egg albumin. Bahan yang digunakan dalam pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) adalah xylol, alkohol 100% , aquades, Harris Hematoxylin , acid alkohol 1% , eosin, alkohol 96%.

4.9 Cara Kerja

4.9.1 Pemeliharaan Mencit

Selama masa pemeliharaan, keenam kelompok mencit mendapatkan perlakuan yang berbeda. Pada kelompok I (kontrol negatif) tidak dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei* dan tanpa pemberian ekstrak batang brotowali maupun artesunat. Pada kelompok II (kontrol positif) dilakukan inokulasi

Plasmodium berghei, namun tanpa pemberian ekstrak batang brotowali maupun artesunat. Pada kelompok III dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei*, dengan pemberian ekstrak brotowali. Sedangkan kelompok IV, V dan VI dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei* dan disertai dengan pemberian ekstrak batang brotowali dan artesunat. Dosis ekstrak batang brotowali untuk kelompok IV s/d VI secara berturut-turut adalah 50 mg/hari, 60 mg/hari, dan 70 mg/hari. Semua kelompok mencit selama penelitian mendapatkan pakan yang normal.

4.9.2 Pembuatan inokulum *Plasmodium berghei*

4.9.2.1 Menghitung jumlah eritrosit/ml darah

Darah diambil dari ujung ekor mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 10 μ l dengan mikropipet yang tip-nya telah dibasahi dengan antikoagulan heparin. Kemudian ditambahkan 990 μ l PBS sehingga menghasilkan larutan I. Kemudian Larutan I diambil sebanyak 10 μ l dan ditambahkan 990 μ l PBS sehingga menghasilkan larutan II. Kemudian dilakukan pengenceran sebanyak 10^4 kali. Selanjutnya jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung eritrosit Naubauer dengan rumus :

$$\text{Jumlah eri/ml darah} = N (\sum \text{eri dlm 5 kotak}) \times 5 \times 10^4 \times 10^4 (\text{pengenceran})$$

4.9.2.2 Menghitung derajat parasitemia (P%)

Derajat parasitemia diperiksa melalui sediaan apus darah tipis dari ujung ekor mencit dengan cara : darah diambil dari ujung ekor mencit kemudian ditetaskan pada gelas obyek, diapus dengan gelas obyek yang lain, dikeringkan pada suhu kamar. Slide digenangi giemsa \pm 45 menit, dicuci pada air mengalir, dikeringkan pada suhu kamar dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000X

dengan minyak emersi. Pemeriksaan pada lapangan pandang dengan susunan tidak menumpuk, dihitung eritrosit terinfeksi parasit per 1000 eritrosit dengan rumus :

$$P\% = \frac{\sum \text{PRBC} \times 100 \%}{1000 \text{ eritrosit}}$$

4.9.2.3 Menghitung jumlah parasit/ml darah dengan rumus :

$$\text{Parasit/ml} = P\% \times \text{jumlah eritrosit/ml}$$

4.9.2.4 Menentukan dosis infeksi

Untuk inokulasi secara intraperitoneal ditetapkan konsentrasi parasit 10^5 dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Sehingga konsentrasi parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi 5×10^5 parasit.

Rumus pengenceran =

\sum parasit/ml darah mencit yang akan ditransfer parasitemianya

\sum parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi

Pungsi darah dari jantung mencit yang akan ditransfer parasitemianya, dan diencerkan dengan PBS sesuai dengan hasil perhitungannya, sehingga dihasilkan konsentrasi parasit $10^5/0,2$ ml larutan darah.

4.9.3 Cara Inokulasi *Plasmodium berghei*

Dengan menggunakan spuit dan jaum insulin 27 ½ G diambil bahan inokulan sebanyak 0,2 ml. Mencit yang akan diinokulasi dipegang tengkuk dan ekornya menggunakan ibu jari dan jari telunjuk (posisi tangan seperti menggenggam) dengan erat diposisikan dengan peritoneum mencit menghadap

ke arah praktikan. Bagian mencit yang akan diinokulasi diolesi alkohol 70% Bahan inokulan disuntikkan intraperitoneal ke mencit. Masing- masing mencit disuntik bahan inokulasi sebanyak 0,2 ml. Menekan bagian peritoneum mencit pada tempat inokulasi dengan menggunakan kapas alkohol dan kemudian secara perlahan – lahan spuit dan jarum dicabut.

4.9.4 Cara Pengambilan sampel jaringan

Mencit dibunuh pada hari ke-14 dengan menggunakan ketamin perinhalasi. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang dan dibuka kulit bagian perut beserta selubung peritoneumnya. Organ hepar diisolasi dan direndam dalam larutan formalin 10% dalam tabung bekas film foto yang sudah diberi label.

4.9.5 Preparasi Irisan Jaringan Hepar

Jaringan hepar diambil dan diiris dengan ketebalan 0,5cm. Jaringan hepar dilakukan snap-frozen dalam cairan isopentana yang didinginkan dengan nitrogen (*nitrogen-cooled isopentane*) pada suhu -55°C sebelum disimpan pada suhu -80°C sampai diperlukan untuk pengirisan. Irisan dengan ketebalan 6 μm dibuat dengan menggunakan cryostat, ditempatkan pada obyek gelas (*glass-slide*) dan selanjutnya dikering-anginkan selama 30 menit. Slide selanjutnya dibungkus dalam aluminium foil dan ditempatkan dalam *freezer* untuk disimpan pada suhu -80°C sampai dilakukan proses lebih lanjut. Sebelum dilakukan pewarnaan, slide-glass dicairkan (*thawed*) selama 30 menit dan difiksasi dalam aseton pada suhu ruangan selama 10 menit. Selanjutnya direhidrasi dalam TBS (Tris buffered saline, 50 mM TRIS, 145 mM NaCl pH 7.6) selama 5 menit. Slide di proses untuk prosedur imunohistokimia lebih lanjut

4.9.6 Prosedur Imunohistokimia pada HSP70 untuk jaringan yang difiksasi dengan formalin

A. Deparafinasi

Sebelum dideparafinasi slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian ditambah dengan larutan xilol selama (2x10menit) kemudian ethanol absolut selama (2x10 menit) dilanjutkan dengan ethanol 90% selama (1x5 menit) kemudian ditambahkan ethanol 80% selama 5 menit dilanjutkan dengan menambahkan ethanol 70% selama 5 m3nit kemudian ditambahkan aquadest steril selama (3x5 menit).

B. Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat

Pertama Slide direndam di dalam *Chamber* berisi buffer sitrat pH 6,0. Kemudian *Chamber* dipanaskan dalam *waterbath* suhu 95°C selama 20 menit. Kemudian slide dikeluarkan dari *waterbath*, tunggu sampai suhu ruang ± 20 menit. Kemudian slide dicuci dengan PBS selama 6 menit.

C. Imunohistokimia

Pada hari pertama slide siap untuk di IHC kemudian ditetaskan 3 % H₂O₂ dalam methanol inkubasi 15 menit dan dicuci dengan PBS 3 x 2 menit. Pada Blocking Unspesifik Protein ditetaskan *Bacground Sniper*, diinkubasi 15 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS 3x2 menit. Kemudian ditetaskan Antibodi Primer (HSP70) yang dilarutkan dalam buffer PBS + 2 % BSA, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Esok harinya dikeluarkan dari 4°C, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS 3 x 2 menit.

Pada hari kedua ditetaskan antibodi sekunder, diinkubasi 30 menit pada suhu ruang dan dengan dicuci PBS 3 x2 menit. Selanjutnya ditetaskan SA-HRP dan diinkubasi 20 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS 3 x 2 menit

dan dibilas dengan Aquadest. Setelah itu ditetaskan DAB (DAB Chromagen : DAB buffer = 1:50) dan diinkubasi 3-10 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci dengan PBS 3x2 menit dan dicuci dengan Aquades 3 x 2 menit. Mayer's Hematoxilen ditetaskan bersama tap water dengan perbandingan 1 : 10 kemudian diinkubasi 5-10 menit pada suhu ruang dan dibilas dengan Tap water. Setelah itu dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop.

4.9.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh untuk setiap perlakuan dianalisa kehomogenan ragamnya dengan menggunakan uji *homogeneity of variance* (uji levene) dengan tujuan untuk mengetahui apakah data yang digunakan mempunyai ragam yang sama sebelum melakukan pengujian dengan ANOVA. Selain uji kehomogenan ragam juga dilakukan pengujian normalitas data untuk mengetahui apakah data yang diuji mempunyai distribusi yang normal atau tidak dengan menggunakan uji *kolmogorof smirnof test*. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan. Juga untuk menguji apakah ada perbedaan yang bermakna antara perlakuan konsentrasi satu dengan konsentrasi yang lain, maka dilakukan analisis dengan menggunakan ANOVA, setelah dilakukan analisis dengan ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji *tukey* untuk mengetahui perbedaan antara kelompok. Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai perbedaan perlakuan nilai rata – rata kelompok perlakuan tersebut dapat dilakukan analisa Post Hoc Tests, adanya perbedaan kelompok perlakuan ditunjukkan jika perlakuan memiliki rata-rata yang terletak pada kolom berbeda. Hasil uji statistik signifikan jika nilai $p < 0,05$.

4.10. Prosedur penelitian in vivo

