

BAB IV

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 Patologi Anatomi dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr Soetomo Surabaya. Waktu penelitian, yaitu bulan Mei – Februari 2015.

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 kriteria inklusi dan eksklusi.

- Kriteria inklusi :
 1. Jenis mencit : mencit galur C57BL/6J
 2. Umur mencit : 12-16 minggu
 3. Berat badan mencit : 20-25 gram
 4. Jenis kelamin mencit : betina

- Kriteria eksklusi :
 1. Mati saat masa adaptasi
 2. Cacat
 3. Tidak bergerak aktif
 4. Tampak sakit

4.5 Estimasi Jumlah Sampel

Pada penelitian ini terdapat 14 kelompok penelitian, yaitu (1) **kelompok kontrol negatif**, (2) **kelompok kontrol positif**, (3) **kelompok injeksi artesunat**, (4) **kelompok sonde brotowali**, (5) **kelompok kombinasi I** (artesunat + brotowali 50mg/hari), (6) **kelompok kombinasi II** (artesunat + brotowali 60mg/hari), dan (7) **kelompok kombinasi III** (artesunat + brotowali 70mg/hari), masing-masing kelompok terdiri dari 2 subkelompok yang dibedah pada hari ke-7 dan ke-14. Jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan rumus $(t-1)(r-1) \geq 15$, dengan t = kelompok perlakuan; r = jumlah sampel mencit. Dari rumus tersebut, jika jumlah perlakuan adalah 14, maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah sebanyak minimal 3, yang diperoleh dari perhitungan sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) = 15$$

$$(14-1)(r-1) = 15$$

$$13(r-1) = 15$$

$$13r - 13 = 15$$

$$13r = 28$$

$$r = 2.15 \approx 3$$

4.6 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infeksi *Plasmodium berghei*, pemberian artesunat dan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispera*) dalam variasi dosis. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah derajat kerusakan histopatologi 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 genetik
2. Metabolisme mencit

4.7 Definisi Operasional

1. Artesunat : merupakan antimalaria turunan artemisinin dalam sediaan ampul di dapat dari Divisi Tropmed Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar.
2. Dosis artesunat : pemberian artesunat dengan dosis 32 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal pada hari ke-4, 5, dan 6 post infeksi.
3. Ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispera* (L) Miers) adalah hasil ekstraksi serbuk (simplisia) batang brotowali (*Tinospora crispera* (L) Miers) menggunakan pelarut etanol. Ekstrak batang brotowali diambil dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bandung.

4. *Plasmodium berghei* : Parasit yang diinokulasikan pada mencit galur C57BL/6J adalah *Plasmodium berghei* ANKA yang diambil dari *Eijkman Molecular Biology Institute* Jakarta.
5. Inokulasi *Plasmodium berghei* : Mencit galur C57BL/6J diinjeksi dengan 1×10^6 (0,2ml) parasitized red blood cells (PRBCs) secara intraperitoneal. Pada literatur, inokulasi 1×10^6 sel darah merah *Plasmodium berghei* dapat mengakibatkan malaria berat (Jambou dkk, 2011).
6. Malaria berat : Malaria berat dibuktikan dengan adanya tanda klinis seperti bulu mencit berdiri, derajat parasitemia yang tinggi, dan infiltrasi sel-sel radang pada gambaran histopatologi ginjal pada mencit galur C57BL/6J yang diinfeksi *P. berghei*.
7. Derajat Parasitemia adalah jumlah parasit malaria bentuk aseksual yang menginfeksi eritrosit dibandingkan dengan seluruh eritrosit yang diamati, untuk menghitungnya menggunakan rumus;

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

8. Jumlah eritrosit yang dihitung adalah 1000 eritrosit pada hapusan darah tipis yang dipulas dengan Giemsa dan diamati dengan pembesaran 1000x.
9. Dosis ekstrak batang brotowali : pemberian ekstrak etanol batang brotowali 50 mg, 60 mg, 70 mg per hari dilarutkan dalam 0,2 cc larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) berdasarkan literatur penelitian sebelumnya dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde.
10. Lama waktu infeksi : waktu mulai mencit diinfeksi *P. berghei* sampai mencit dimatikan yaitu pada hari ke-7 dan 14.
11. Lama pemberian dosis : Pemberian ekstrak batang brotowali dimulai pada hari ke-4 post infeksi selama 3 hari untuk kelompok mencit yang

dimatikan pada hari ke-7 dan 10 hari untuk kelompok mencit yang dimatikan pada hari ke-14.

12. Derajat kerusakan histopatologi hepar : Penentuan derajat kerusakan histopatologi hepar, diperiksa di bawah mikroskop masing-masing pada 10 lapang pandang mikroskopik. Pemeriksaan dengan mikroskop dilakukan dengan pembesaran 1000x. Pada setiap lapang pandang dihitung jumlah sel hepatosit yang mengalami nekrosis, *vacuolated cell*, dan sel kupffer. Sel nekrosis memberikan gambaran sel yang lebih eosinofilik pada pewarnaan hematoksilin dan eosin. Sel nekrosis terlihat membesar dan plasma membrannya tidak utuh. Perubahan nukleus pada sel nekrosis mulai dari *pyknosis*, *karyorrhexis*, sampai *karyolysis* (Robbins dan Cotran, 2010). Vakuola pada sel *vacuolated* terbentuk dari fragmentasi retikulum endoplasma halus yang mengalami dilatasi (Nikolaus dan Werner, 2004). Sel kupffer adalah sel fagosit khusus di hepar yang berasal dari monosit darah dan terdapat di dalam sinusoid. Sel kupffer memiliki inti yang lebih besar dibandingkan sel endotel dan memiliki sitoplasma yang bercabang dengan batas sel yang tidak teratur (Victor, 2003).

4.8 Cara Kerja

4.8.1 Pemeliharaan Mencit

Selama masa pemeliharaan, mencit diadaptasi di dalam kandang yang diletakkan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari pada suhu 18-22°C. Pada awal percobaan, semua mencit ditimbang berat badannya dan dilakukan randomisasi agar setiap hewan coba mendapat peluang yang sama untuk mendapat perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif, mencit dibunuh setelah masa adaptasi. Pada kelompok kontrol positif, mencit tidak

diterapi apapun. Pada kelompok artesunat, mencit diterapi dengan artesunat. Pada kelompok brotowali, mencit diterapi dengan ekstrak batang brotowali. Sedangkan kelompok kombinasi I, II, dan III mencit diterapi dengan ekstrak batang brotowali dan artesunat. Dosis ekstrak batang brotowali untuk kelompok kombinasi I sampai dengan III secara berturut-turut adalah 50 mg/hari, 60 mg/hari, dan 70 mg/hari. Masing-masing kelompok terdiri dari 2 subkelompok yang dibedah pada hari ke-7 dan ke-14.

4.8.2 Pembuatan Inokulum *Plasmodium berghei*

4.8.2.1 Menghitung jumlah eritrosit/ml darah

Menghitung jumlah eritrosit/ml darah, dilakukan dengan cara darah diambil dari ujung ekor mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 10 μ l dengan mikropipet yang tipnya telah dibasahi dengan antikoagulan heparin. Kemudian ditambahkan 990 μ l PBS sehingga menghasilkan larutan I. Setelah itu, 10 μ l larutan I diambil dan kemudian ditambahkan 990 μ l PBS sehingga menghasilkan larutan II. Telah dilakukan pengenceran 10^4 kali. Jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung eritrosit Naubauer dengan rumus :

$$\text{Jumlah eri/ml darah} = N (\sum \text{eri dlm 5 kotak}) \times 1 \times 10^6 \times 10^4$$

(pengenceran)

4.8.2.2 Menghitung derajat parasitemia (P%)

Derajat parasitemia diperiksa melalui sediaan apus darah tipis dari ujung ekor mencit dengan cara darah diambil dari ujung ekor mencit. Setelah itu, darah ditetaskan pada gelas obyek lalu

diapus dengan gelas obyek yang lain. Selanjutnya, apusan darah ditetesi dengan methanol dan tunggu sampai kering. Setelah itu, apusan darah digenangi giemsa ± 45 menit. Setelah 45 menit, preparat dicuci pada air mengalir kemudian dikeringkan pada suhu kamar. Preparat 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 :

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

4.8.2.3 Menghitung jumlah parasit/ml darah dengan rumus :

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

4.8.2.4 Menentukan dosis infeksi

Untuk inokulasi secara intraperitoneal ditetapkan konsentrasi parasit 10^6 dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit. Sehingga konsentrasi parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi 5×10^6 parasit.

$$\text{Rumus pengenceran} = \frac{\sum \text{parasit/ml darah mencit yang akan ditransfer parasitemianya}}{\sum \text{parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi}}$$

Pungsi darah dari jantung mencit yang akan ditransfer parasitemianya, dan diencerkan dengan PBS sesuai dengan hasil perhitungannya, sehingga dihasilkan konsentrasi parasit $10^6/0,2$ ml larutan darah.

4.8.3 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Dengan menggunakan spuit dan jarum 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.

4.8.4 Pengambilan Organ Hepar

Mencit dimatikan pada hari ke-7 dan 14 dengan menggunakan kloroform perinhalasi. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang dan dibuka kulit bagian perut beserta selubung peritoneumnya. Organ hepar diambil seluruhnya. Organ direndam dalam larutan formalin 10% dalam tabung yang sudah diberi label.

4.8.5 Pembuatan Slide Histopatologi (Metode Blok Parafin)

Organ hepar yang telah difiksasi dengan formalin 10% diletakkan dalam kaset kemudian kaset yang berisi jaringan didehidrasi dengan direndam dalam alkohol bertingkat konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% , dan dua kali alkohol absolut, masing-masing 30 menit. Kemudian dilakukan *clearing* dengan xilol 2 kali selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak pada suhu 42-46°C selama 1 jam sebanyak 2 kali. Kemudian dilakukan *blocking* dengan parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari pada suhu 46-52°C. Keesokan harinya

ditempelkan *holder* dan dilakukan pemotongan. Setelah pemotongan dengan rotari mikrotom setebal 4-6 μ m, jaringan ditempelkan pada *obyek glass* dan kemudian dipanaskan 60°C. Sebelum proses pewarnaan dilakukan deparafinisasi, yaitu direndam dalam xilol 2 kali selama 5 menit, kemudian dilakukan rehidrasi pada alkohol bertingkat dengan urutan 2 kali alkohol absolut, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% masing-masing selama 5 menit, kemudian dibilas H₂O selama 5 menit. Preparat kemudian diwarnai dengan Hematoksilin Eosin (HE).

4.8.6 Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit, diwarnai dengan hematoksilin selama 10 menit, kemudian direndam dalam *tap water* 10 menit, kemudian dibilas dengan H₂O. Selanjutnya dilakukan dehidrasi pada alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing 5 menit. Pewarnaan dengan larutan eosin selama 3 menit, setelah itu dibilas dengan alkohol 30%, kemudian dicuci dengan H₂O selama 5 menit dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

4.8.7 Evaluasi Derajat Kerusakan Histopatologi Hepar

Sel kupffer merupakan sel monosit yang berada di jaringan hepar. Sel kupffer memiliki peranan penting dalam pertahanan tubuh dan perkembangan penyakit hepar. Salah satu peran penting dari sel kupffer adalah degradasi hemoglobin. Sel darah merah yang malformasi akan dibersihkan oleh sel kupffer. Selain itu, aktivasi sel kupffer oleh pajanan endotoksin bakteri gram negatif dan juga faktor komplemen C3a dan C5a,

menyebabkan reaksi inflamasi dan juga mengaktifkan enzim NADPH oksidase yang membantu menghancurkan organisme yang difagositosis dengan cara menghasilkan *oxide anions* (Bilzer dkk, 2006). Oleh karena itu, pada penelitian dilakukan perhitungan sel kupffer yang berpengaruh pada derajat kerusakan hepar. Perhitungan jumlah sel kupffer diperiksa di bawah mikroskop masing-masing pada 10 lapang pandang mikroskopik dengan pembesaran 1000x dengan minyak emersi. Sel kupffer yang dihitung adalah sel yang memiliki inti yang lebih besar dibandingkan sel endotel dan memiliki sitoplasma yang bercabang dengan batas sel yang tidak teratur (Victor, 2003).

Sel akan terus-menerus menyesuaikan struktur dan fungsinya untuk menyesuaikan perubahan kebutuhan dan stres ekstraseluler. Terdapat 2 perubahan morfologi yang utama pada cedera sel yang reversible, yaitu pembengkakan sel (*cellular swelling*) dan perubahan lemak (*fatty change*). Vakuola pada sel *vacuolated* terbentuk dari fragmentasi retikulum endoplasma halus yang mengalami dilatasi (Nikolaus dan Werner, 2004). Secara mikroskopik, bisa tampak vakuola kecil itu menggambarkan segmen retikulum endoplasma yang berdistensi dan menekuk (Robbins dan Cotran, 2010). Pada *fatty change* terlihat adanya vakuola lemak di sitoplasma yang terutama terjadi pada sel hepatosit dan sel otot jantung. Pada penelitian ini, *vacuolated cell* dihitung pada 10 lapang pandang dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

Cedera yang terus menerus akan mengakibatkan sel mengalami nekrosis. Sel nekrosis ditandai dengan pembengkakan sel, denaturasi protein dan kerusakan organela. Morfologi dari sel nekrosis merupakan hasil dari denaturasi protein intraseluler dan pencernaan enzimatik dari

sel yang terluka. Sel nekrosis tidak dapat menjaga integritas membran sehingga seringkali isinya keluar. Sel nekrosis memberikan gambaran sel yang lebih eosinofilik pada pewarnaan hematoksilin dan eosin. Sel nekrosis terlihat membesar dan plasma membrannya tidak utuh. Perubahan nukleus pada sel nekrosis mulai dari *pyknosis*, *karyorrhexis*, sampai *karyolysis* (Robbins dan Cotran, 2010). Perhitungan sel nekrosis semikuantitatif karena sel nekrosis yang dihitung adalah sel nekrosis yang membran selnya masih terlihat. Sel nekrosis dihitung pada 10 lapang pandang dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

4.8.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis secara statistik. Apabila minimal salah satu kelompok memiliki sebaran data tidak normal, uji statistik yang dipilih adalah uji *Kruskal-Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Apabila semua kelompok memiliki sebaran data normal, selanjutnya perlu identifikasi varian antar kelompok. Apabila varian sama (nilai p pada uji varian $>0,05$), uji statistik yang dipilih adalah uji *Oneway ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

4.9 Prosedur Penelitian *inVivo*

