

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara in vivo. Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c. Sampel penelitian adalah mencit dengan kriteria inklusi sebagai berikut: mencit betina galur Balb/c yang belum pernah bunting sebelumnya (primigravida), tidak cacat fisik, mencit dewasa umur 13-16 minggu, dan memiliki berat badan 20-30 gram. Kriteria eksklusi mencit sebagai berikut: mencit galur Balb/c yang telah bunting sebelum dikawinkan dengan mencit jantan dan mencit galur Balb/c bunting yang mati sebelum dibedah.

Penelitian ini membagi sampel dalam dua kelompok yaitu, kelompok kontrol adalah kelompok mencit bunting tanpa diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA dan kelompok perlakuan adalah kelompok mencit bunting dengan diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA. Besaran sampel untuk masing-masing kelompok perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus  $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$ , dengan  $n$  = jumlah pengulangan tiap perlakuan;  $p$  = jumlah perlakuan.

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

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

$$2n - 1 \geq 17$$

$$2n \geq 18$$

$$n \geq 9$$

Dari rumus tersebut diperoleh ukuran sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok adalah 10, sehingga mencit yang diperlukan untuk penelitian ini berjumlah 20 ekor. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *Simple Random Sampling*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mardhiyyah, 2011, keberhasilan kebuntingan mencit galur balb/c sebesar 40%, sehingga dibutuhkan mencit sebanyak 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* ANKA pada mencit dengan kelompok kontrol positif.

#### 4.3.2 Variabel Antara

Variabel antara dalam penelitian ini adalah derajat parasitemia.

#### 4.3.3 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah berat badan janin pada mencit dan ekspresi CD8 pada jaringan plasenta mencit.

#### 4.3.4 Variabel Kendali

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

penelitian ini adalah jenis mencit, umur mencit, usia kehamilan mencit, primigravida, berat badan mencit, dan pemberian diet.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

#### 4.5 Definisi Operasional

##### - Umur Kebuntingan Mencit

Umur kebuntingan mencit dihitung mulai dari waktu mencit dikawinkan sampai mencit dibedah pada hari ke-18 setelah pengawinan. Hari pertama kebuntingan terhitung sejak mencit betina dan mencit jantan dipisahkan.

##### - Lama Waktu Infeksi

Lama waktu infeksi dihitung sejak mencit diinokulasi *P. Berghei* pada hari ke-9 pasca kawin sampai dengan mencit dimatikan pada hari ke-18 pasca kawin.

##### - *Plasmodium berghei*

*Plasmodium berghei* adalah Plasmodium yang menginfeksi mencit, pada manusia memberi gejala yang sama dengan *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium berghei* 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.

##### - Derajat parasitemia

Derajat parasitemia adalah persentase jumlah parasit yang ditentukan dihitung dengan 1000 eritrosit pada sediaan hapusan tipis. Sediaan hapusan tipis tersebut dibuat dari darah mencit dengan pengecatan Giemsa.

#### - Peningkatan ekspresi CD8

Peningkatan ekspresi CD8 ini diukur dengan cara imunohistokimia dengan antibodi monoklonal CD8 (SP16) dari Thermo dengan pabrik NeoMarker dan nomor katalog RM-9116-S0. Peningkatan ekspresi CD8 dihitung dengan cara menghitung rerata limfosit yang terekspresi CD8 pada kelompok perlakuan dan kontrol.

#### - Berat badan janin rendah

Deteksi *intrauterine growth restriction* (IUGR) pada janin dilakukan dengan cara menimbang berat badan janin menggunakan neraca analitik. Janin dikatakan memiliki berat badan yang tidak normal jika berada di bawah berat badan janin pada kelompok kontrol.

### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.6.1 Perawatan mencit

Alat dan bahan yang digunakan dalam perawatan mencit adalah bak plastik sebagai kandang mencit, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, makanan mencit yang terdiri dari BR1 pakanan olahan ternak untuk memenuhi kecukupan nutrisi mencit, tepung, dan kecambah kacang hijau (Sardjono, 2007), sekam, timbangan berat badan dengan neraca mencit. Suatu literatur menyebutkan bahwa beberapa kandungan gizi dalam kecambah memiliki kadar lebih rendah dibandingkan biji kacang hijau, namun kandungan gizi dalam bentuk senyawa terlarut lebih mudah diserap tubuh (Astawan, 2005; Anggrahini, 2009).

#### 4.6.2 Inokulasi *Plasmodium berghei*

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

Bahan : *Plasmodium berghei* dari darah mencit terinfeksi, larutan PBS, larutan M<sup>+</sup>, *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA), kapas, alkohol, larutan giemsa, metanol p.a., dan buffer giemsa.

#### 4.6.3 Pengukuran Derajat Parasitemia

Alat : pipet, gunting, *object glass*, dan mikroskop.

Bahan : metanol p.a., buffer giemsa, larutan giemsa, aquades, dan minyak emersi.

#### 4.6.4 Pembedahan Mencit

Alat : Gunting bedah, *scalpel*, steroform atau plastik tempat jaringan, pinset, kapas, jarum pentul, *sprayer*, botol plastik tempat jaringan, neraca analitik Mettler AE 50, dan wadah tertutup untuk narkose.

Bahan : Kloroform, spuit insulin 1 ml, formalin 10%, alkohol atau etanol 70%.

#### 4.6.5 Pembuatan Spesimen Histopatologi

Alat : *tissue tex processor*, inkubator, *hot plit*, *water bath*, mikrotom, *object glass*, dan *cover glass*.

Bahan : xylol, alkohol 96%, parafin, entelan, formalin / PFA.

#### 4.6.6 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%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metanol, aquades, larutan diva, dan larutan *universal decloaker*.

#### 4.6.7 Immunohistokimia

Alat : *staining chamber*, vortex, pipet tetes, tabung ukur, *object glass*, *cover glass*, dan mikroskop.

Bahan : antiidi primer monoclonal CD8 (SP16) Thermo, larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 5%, *Strep Avidin-Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP), *Diamono Benzidine* (DAB), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, Mayer Hematoksilin, dan antibodi sekunder.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Pembuntingan mencit

Mencit bunting diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada. 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.

Pembuntingan mencit dilakukan secara simultan setelah dipersiapkan sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan fenomena biologis yaitu *Leeboot effect*, *Pheromon effect* dan *Whiten effect* (Sardjono, 2005). Sinkronisasi estrus secara alami 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 birahinya yang sebelumnya terhenti, bila dipapar dengan bau-bauan yang berasal dari pejantan, misalnya urin atau sekam yang mengandung urin pejantan. Keadaan ini disebut *pheromone effect*. Kemudian mencit betina akan mengalami birahi pada malam ke tiga (72 jam) setelah pemaparan. Fenomena ini disebut *Whitten effect*. Mencit dikawin selama 1 malam dengan setiap kandang terdapat 1 mencit betina dan 1 mencit jantan.

Hari pertama kebuntingan dihitung setelah mencit dikawinkan selama 1 malam dan mencit betina dipisahkan dari mencit jantan. Dari sejumlah sampel mencit betina yang dikawinkan, tidak semua mencit betina bunting. Setelah pembedahan mencit, derajat kebuntingan atau *pregnancy rate* dari penelitian ini dihitung guna mengetahui peluang kebuntingan mencit dari sejumlah sampel. *Pregnancy rate* dapat dihitung dengan cara membagi jumlah mencit yang bunting dengan jumlah mencit yang dibuntingkan dan dikali dengan 100%. Hasil dari derajat kebuntingan tersebut dapat digunakan sebagai dasar penentuan jumlah mencit yang dibutuhkan agar mencapai sampel yang diharapkan. Hasil tersebut dapat digunakan pada penelitian lanjutan atau pada penelitian yang memiliki prosedur membuntingkan mencit galur Balb/c.

#### 4.7.2 Inokulasi *P. berghei* galur ANKA

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 mencit. Hapusan darah yang telah dipulas dengan pewarna *Giemsa*, selanjutnya dilihat di bawah mikroskop pembesaran 1000x untuk dihitung parasitemianya. Perhitungan persen parasitemia yaitu,

$$\% \text{Parasitemia} = \frac{\text{jumlah eritrosit yang terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%.$$

Setelah parasitemia mencit donor mencapai 10% sampai dengan 15%, berarti mencit donor tersebut telah siap digunakan sebagai donor infeksi mencit perlakuan (Hafid *et al.*, 2011; Mardhiyyah, 2011).

Inokulasi hewan coba dilakukan pada hari ke sembilan setelah perkawinan mencit pada saat organogenesis. Trimester pertama pada mencit terjadi pada hari ke-8 sampai dengan hari ke-10 kebuntingan. Dalam penelitian Duarte *et al.*, 2012, tentang malaria plasenta, infeksi yang terjadi pada hari ke-10 kebuntingan mencit menimbulkan ekspansi parasit yang signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa dampak nyata malaria kehamilan dapat diamati pada kebuntingan mencit trimester pertama (Duarte *et al.*, 2012).

Inokulasi dilakukan secara intraperitoneal sebanyak  $10^6$  parasit dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit (Darlina dan Devita, 2006). Jumlah eritrosit per ml darah dan parasitemia mencit donor yang akan ditransfer parasitnya terlebih dahulu dihitung. Untuk menghitung jumlah eritrosit, darah diambil dari ujung ekor sebanyak 10 $\mu$ L dan dilakukan pengenceran  $10^4$  dengan larutan PBS. Kemudian jumlah eritrosit dihitung dalam kamar hitung 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 parasitemia. Jumlah parasit yang hendak diberikan sebesar  $1 \times 10^6$ /ml darah, sehingga pengenceran

yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah parasit tersebut adalah jumlah parasit/ $1 \times 10^6$  (Blazquez *et al.*, 2008).

Dengan mengalikan jumlah eritrosit per ml darah dengan parasitemia, didapatkan jumlah parasit per ml darah. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan larutan M<sup>+</sup> untuk mendapatkan konsentrasi parasit  $10^6$  dalam 0,2 ml darah, kemudian larutan tersebut ditransfer secara intraperitoneal ke mencit perlakuan sebanyak 0,2 ml.

#### 4.7.3 Pengukuran Derajat Parasitemia

Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis. Darah tersebut diambil dari ujung ekor mencit dengan menggunting sedikit ujung ekor mencit lalu diteteskan ke *object glass*. Tetesan darah tersebut kemudian dibuat hapusan dengan menggunakan *object glass* lainnya dengan sudut  $45^\circ$ . Hapusan darah kemudian difiksasi dengan metanol selama 30 detik dan ditunggu hingga kering. Setelah itu preparat ditetesi dengan campuran larutan giemsa dan buffer pro giemsa dengan perbandingan 1 : 9 atau pengenceran 10% dengan menggunakan pipet. Pengecatan tersebut ditunggu selama 30 menit. Lalu dibilas dengan aquades mengalir dan ditunggu hingga kering (Moll *et al.*, 2008).

Derajat parasitemia dilihat dengan memeriksa hapusan darah menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak emersi. Untuk perhitungan persentase parasitemia dihitung berdasarkan jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dalam 1000 eritrosit. Pengambilan darah ekor untuk pengukuran derajat parasitemia dilakukan setiap hari.

#### 4.7.4 Pembedahan Mencit

Setelah perlakuan hari ke-18, mencit dibedah untuk diambil organ plasentanya. Berdasarkan penelitian Neres, *et al.*, 2008, pembedahan mencit dilakukan antara hari kebuntingan ke-17 dan ke-19 untuk menjaga ketahanan janin dan observasi patologi plasenta. Pembedahan mencit dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup yang sudah berisi kapas. Mencit yang sudah diberi anestesi diletakan di atas sterofoam, difiksasi ekstremitasnya dengan jarum pentul, lalu dibedah mulai dari abdomen dengan cara, pertama desinfeksi kulit abdomen dengan menggunakan ethanol 70% untuk mencegah lepasnya rambut mencit ketika melakukan insisi. Insisi horizontal dimulai dari mid abdomen yaitu dibawah *processus xyphoideus* dengan menggunakan scalpel. Lebarkan insisi ke arah rongga thoraks dengan menggunakan gunting bedah (Thiberge *et al.*, 2007).

Janin dan plasenta mencit diambil dengan menggunakan pinset dan selanjutnya janin ditimbang dengan menggunakan neraca analitik Mettler AE50. Kemudian plasenta disimpan dalam botol jaringan dengan menggunakan formalin 10% sebagai fiksator. Mencit yang sudah dibedah dan janin selanjutnya dikuburkan di dalam tanah.

#### 4.7.5 Pembuatan Spesimen Histopatologi Plasenta

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, telah didapatkan 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  $\mu\text{m}$ . Setelah dilekatkan pada kaca benda (*object glass*), irisan dapat diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entelan dan ditutup menggunakan *cover glass*.

#### 4.7.6 Deparafinisasi

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

Langkah pertama deparafinisasi adalah preparat jaringan dimasukkan kedalam 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 dicuci dengan air mengalir dan dicelupkan ke dalam akuades selama 3 hingga 5 menit. Preparat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 95ml larutan campuran  $\text{H}_2\text{O}_2$ , metanol, dan aquades selama 20 menit. Larutan campuran tersebut terdiri dari 5 ml metanol dan 1,6 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 180ml : 20ml. Kemudian preparat bersama larutan diva dimasukkan ke dalam alat *decloaking chamber* selama 45 menit dan pada pengaturan suhu

diatur menjadi 95<sup>o</sup>. Tutup alat *decloaking chamber* baru dapat dibuka bila suhu sudah turun secara otomatis mencapai dibawah 90<sup>o</sup>.

#### 4.7.7 Immunohistokimia

Prosedur pengecatan immunohistokimia terdiri dari beberapa tahap. Tahap pertama adalah *Antigen Retrieval* dengan menggunakan xylol dan alat *decloaking chamber* selama 50 menit. Kemudian dilakukan *blocking peroxidase endogen*. Setelah slide siap untuk dilakukan immunohistokimia, slide dicuci dengan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 3 x 5 menit. Slide diaplikasikan dalam 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol dan inkubasi selama 15 sampai dengan 20 menit. Jika larutan campuran H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan metanol yang akan digunakan sebanyak 1000 mikroliter, reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 30% ditambahkan sebanyak 100 mikroliter agar mencapai konsentrasi 3% dan metanol ditambahkan sebanyak 900 mikroliter. Kemudian slide dicuci dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah *Blocking Unspecified Protein*. Tambahkan 0,25% Triton dalam buffer larutan campuran PBS dan 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS) selama 60 menit pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah inkubasi antibodi primer. Ditambahkan antibodi primer yang dilarutkan dalam buffer PBS + 5% FBS. Reagen FBS primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal CD8 (SP16) dari Thermo. Kemudian slide dinkubasi selama satu malam dalam suhu 4<sup>o</sup>C. Slide dimasukkan ke dalam *staining chamber* agar tetap dalam keadaan lembab. Setelah satu malam, slide dicuci dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit.

Setelah inkubasi antibodi primer, dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder. Slide ditambahkan antibodi sekunder dan inkubasi selama 60 menit

pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit. Selanjutnya tambahkan SA-HRP dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci kembali dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit.

Selanjutnya aplikasikan kromagen untuk HRP yaitu DAB pada slide. Perbandingan DAB dan buffer DAB yang digunakan adalah 1 : 50. Inkubasi selama 10 sampai dengan 20 menit pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci dengan larutan PBS steril 3 x 5 menit dan dicuci dengan aquades selama 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya yaitu *counterstain* dengan Mayer Hematoxilen. Perbandingan Mayer dengan *tap water* yang ditambahkan adalah 1 : 5. Selanjutnya diinkubasi selama 5 sampai dengan 10 menit pada suhu ruang. Kemudian bilas dengan *tap water* steril 3 x 5 menit.

Tahap terakhir adalah *mounting* dengan *entellan*. *Entellan* adalah lem untuk merekatkan *cover glass* dan membuat slide menjadi bening. Slide dikering anginkan terlebih dahulu kemudian *dimounting dengan entellan* dan *cover glass*. Preparat yang telah dilakukan immunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop.

#### 4.7.8 Pengamatan Ekspresi CD8

Ekspresi CD8 dideteksi dari warna coklat pada sitoplasma limfosit yang terakumulasi di jaringan plasenta dan warna biru pucat hingga biru gelap pada nukleus sel nya (Datashet CD8 Cell Marque). Slide diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak emersi. Setiap slide diamati sebanyak 20 lapang pandang dan dicatat jumlah limfosit yang terekspresi CD8 (warna coklat pada sitoplasma sel) serta dihitung rerata setiap slide. Setelah semua slide diamati dan dihitung jumlah limfosit yang terekspresi, rerata jumlah

sel tersebut pada setiap kelompok dihitung yaitu, kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

#### 4.7.9 Pemeriksaan Berat badan Lahir Janin

Gangguan perkembangan janin diukur melalui berat badan fetus menggunakan neraca analitik. Penimbangan berat badan janin dilakukan setelah parturisi yaitu pada hari ke delapan belas setelah perkawinan. Janin di pisahkan dengan plasenta dan di bersihkan selaput lendirnya. Selanjutnya di timbang satu persatu dengan menggunakan neraca analitik Mettler AE 50 dengan satuan ukuran gram.

### 4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisa Data

#### 4.8.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Hari ke-4 setelah diinokulasi *Plasmodium berghei*, setiap hari dilakukan pengamatan derajat parasitemia pada mencit.
- Setelah pembedahan mencit dilakukan penghitungan berat badan janin mencit.
- 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 CD8.

#### 4.8.2 Analisa Data

Dari data pengamatan dan pengukuran dilakukan analisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: uji normalitas

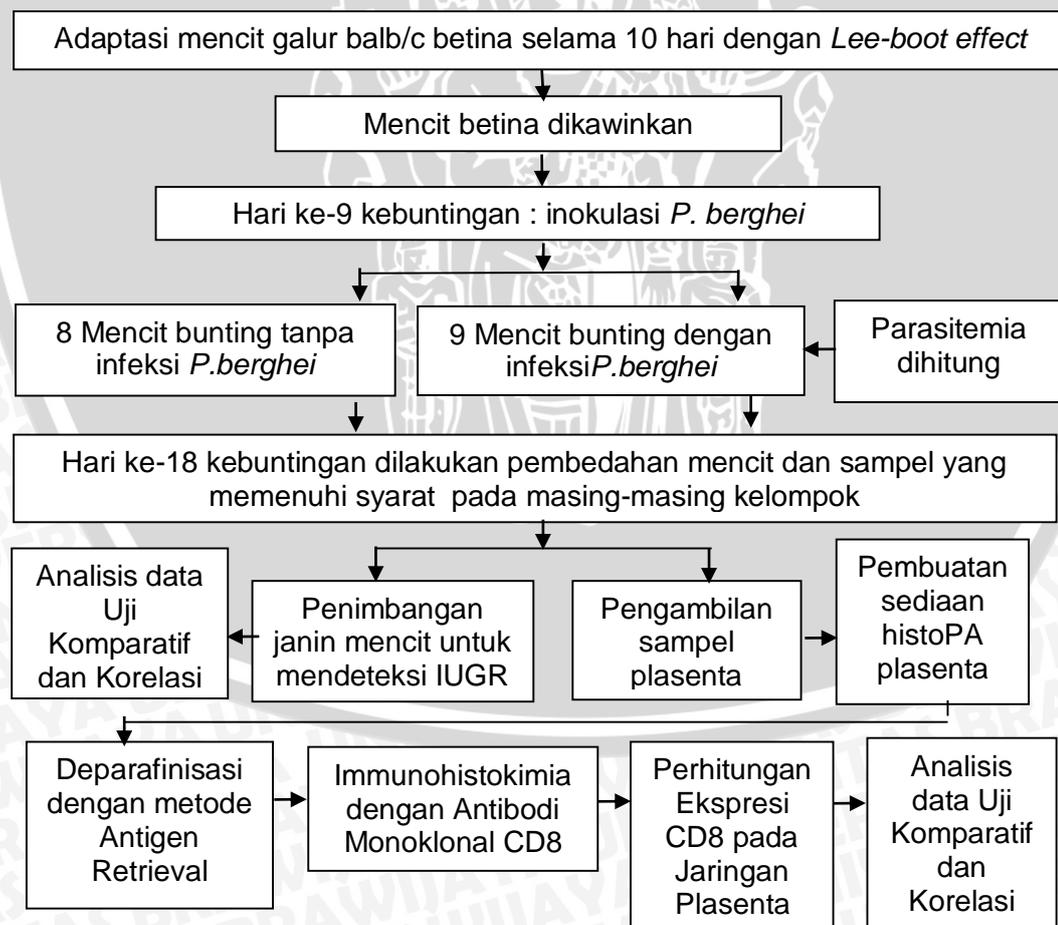
data, uji homogenitas varian, uji t tidak berpasangan atau *Independent T Test*, dan uji korelasi *Pearson*.

#### 4.9 Etika Penelitian

Penelitian ini mendapat *ethical clearance* dari Tim Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Secara *in vivo*, hewan coba diperlakukan sebaik mungkin supaya tidak menyakiti saat perlakuan. Proses pembedahan menggunakan metode anestesi yang tidak menyakiti hewan coba.

#### 4.10 Alur Penelitian

Secara skematis, desain penelitian penelitian digambarkan dalam Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Bagan Desain Penelitian