

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan pada kultur *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*.

4.2 Populasi dan Sampel

Biakan *Plasmodium falciparum* galur 3D7 yang didapat dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Setiap kelompok kontrol dan perlakuan digunakan tiga kali pengulangan sampel.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam waktu empat bulan, dari bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian



Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis antibodi proteasome dengan 3 dosis berbeda ditambah 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, dengan pembagian kelompok sebagai berikut :

- a. Kelompok KP : Kelompok kontrol positif (kultur *P.falciparum* 3D7 tanpa perlakuan apapun)
- b. Kelompok A : Kelompok perlakuan A (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 100µg/mL)
- c. Kelompok B : Kelompok perlakuan B (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 200µg/mL)
- d. Kelompok C : Kelompok perlakuan C (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi Antibodi Proteasom dosis 300µg/mL)
- e. Kelompok D : Kelompok perlakuan D (kultur *P.falciparum* 3D7 dengan diberi antibody dari kelinci kontrol yang hanya diinjeksi dengan TrisHCL dan Adjuvan)
- f. Kelompok KN: Kelompok kontrol negatif (kultur eritrosit normal)

4.4.2 Variabel Terikat Penelitian

Variabel Terikat dalam penelitian ini adalah densitas protein terpoliubiquitinasi.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Kultur *Plasmodium falciparum* yang digunakan adalah kultur *Plasmodium falciparum* 3D7, merupakan *Plasmodium falciparum* yang masih peka terhadap klorokuin dan dibiakkan menurut teknik candle-jar dari Trager Jensen (*Method in malaria Research*).

2. Antigen proteasom merupakan antigen dari Kit Fluorometri Proteasom Ubiquitin (Cayman's).
3. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik FKUB.
4. *Antibodi Proteasom* : merupakan hasil koleksi Antibodi spesifik dari kelinci yang diinduksi dengan *Antigen proteasom*.
5. Jumlah parasit dihitung berdasarkan jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* 3D7 pada semua stage dibandingkan dengan jumlah seluruh eritrosit dengan hapusan darah menggunakan pengecatan Giemsa.
6. Pengukuran densitas protein terpoliubiquitinasi dilakukan dengan metode *western blot* di Laboratorium Biomedik FKUB.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Antibodi

4.6.1.1 Alat dan Bahan Inokulasi Protein Proteasom ke Kelinci

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

4.6.1.2 Alat dan Bahan *Dot blotting* Antibodi Kelinci yang Telah Diproduksi

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk *Dot blotting* Antibodi kelinci yang terbentuk dari pemberian antigen Proteosome, Assay Buffer proteosome dengan perbandingan (0,5:2,5); (0,25:2,5); dan (0,124:2,5)

sebanyak 10 μ L, membran nitrocelulosa, alat Bio-Dot Apparatus Bio-Rad, TBS-Skim Milk 5%, TBS-Tween 0,05%, antibodi primer (antibodi proteasome yang telah di-SAS dan di encerkan dalam TBS (Tris Buffer Saline, antibodi sekunder (Anti-rabbit Alkaline Phosphatase conjugate), BCIP-NBT Substrate, dan aquades.

4.6.2 Alat dan Bahan Biakan *P.falciparum*

Bahan yang digunakan adalah Medium minus, Larutan sodium bicarbonat 5%, medium komplit, Medium plus, PBS. Alat yang digunakan *vertikal laminar airflow*, inkubator CO₂, ssentrifus, botol biakan (*culture flask*) 25 ml, 24 well culture, membran filter 0,2 μ m, pipet 2 ml dan 5 ml, Laboratory bottle 100 ml, *sput* 2,5 ml dan 10 ml, gelas obyek, *Nitrogen liquid tank*.

4.6.3 Alat dan Bahan *Thawing P. falciparum*

Alat yang digunakan adalah sput insulin 1 mL, sentrifus, *flask culture*. Bahan yang digunakan adalah NaCl 12%, NaCl 1,6%, glucose, dan RPMI

4.6.4 Alat dan Bahan Pemberian Antibodi dengan Ab-DeliverIN

Alat dan bahan yang dibutuhkan adalah serum/plasma antibodi poliklonal proteasom, Ab DeliverIN, sput insulin 1ml.

4.6.5 Alat dan Bahan Pengecatan Giemsa

Alat dan bahan yang diperlukan adalah *Methanol* absolut (Merck), *Giemsa* (Sigma), buffer giemsa dan PBS, gelas obyek, gunting steril, mikroskop, pipet, kapas alkohol, buffer Giemsa dan larutan Giemsa, methanol p.a., minyak emersi.

4.6.6 Alat dan Bahan *Western Blot Ubiquitin*

Alat dan bahan yang digunakan adalah gel SDS-PAGE, kertas saring nitroselulose, anti*Ubiquitin*.

4.6.7 Alat dan bahan untuk Sanitasi dan Higienisasi

Tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, alkohol dan *cotton ball*.

4.7 Metode Pengumpulan Data dan Prosedur Penelitian

4.7.1 Metode Pengumpulan Data

Data yang diambil berupa data parasitemia, morfologi parasit dan densitas protein terpoliubiquitinasi .

4.7.2 Prosedur Penelitian

4.7.2.1 Pembuatan Ab-Proteasom

4.7.2.1.1 Inokulasi Proteasom pada Kelinci

Kelinci yang digunakan dalam penelitian ini untuk produksi antibodi adalah kelinci berwarna putih, jantan, sehat, lincah dan berusia 4-6 bulan. Protein Proteasom yang telah diisolasi dilarutkan PBS sebanyak 1000 μ g/mL campurkan dalam suspensi cair dengan CFA dengan perbandingan 1:1 menggunakan vortex. Protein + CFA diinjeksikan subkutan CFA pertama kali, dan dilanjutkan dengan pemberian Proteasom + IFA diinjeksi subkutan. Pemberian Protein + Adjuvan dilakukan selama 8 minggu (*Primm, Guide Polyclonal Antibodies Against Antigen supplied by customer*).

4.7.2.1.2 Dot blotting Antibodi Kelinci yang Telah Diproduksi

Mengencerkan antigen Proteosome pada Assay Buffer proteosome dengan perbandingan (0,5:2,5); (0,25:2,5); dan (0,124:2,5) sebanyak 10 μ L. Membran nitroselulosa dirangkai pada alat Bio-Dot Apparatus Bio-Rad. Masukkan protein yang telah diencerkan dalam



sumuran 50 μ L, dibiarkan *overnight*. Blocking dengan TBS-Skim Milk 5% overnight pada suhu ruang. Cuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit) goyang pelan, kemudian inkubasi dalam antibodi primer (antibodi proteasome yang telah di-SAS dan di encerkan dalam TBS (Tris Buffer Saline) dengan perbandingan 50:500 (v/v)) selama 2 jam pada suhu ruang, cuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit) goyang pelan, kemudian inkubasi dalam antibodi sekunder (Anti-rabbit Alkaline Phosphatase conjugate) selama 1 jam suhu ruang. Cuci dengan TBS-Tween 0,05% (3x3 menit), inkubasi dalam BCIP-NBT Substrate selama 15 menit dalam ruang gelap, berikan aquades dan keringkan.

4.7.2.3 Thawing dan Biakan *P. falciparum*

4.7.2.3.1 Preparasi Serum Manusia

Darah vena dari donor golongan darah O dikoleksi ke dalam 50 ml tabung steril menggunakan kit transfusi tanpa anti-koagulan (lima tabung). Dibiarkan selama 24 jam (*overnight*) pada suhu 4°C. Darah disentrifus pada 3500 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Serum dikoleksi dan disterilkan dengan melewati filter 0,2 μ m. Inaktivasi serum pada suhu 56°C selama 60 menit. Dapat disimpan pada -20°C dalam *deep freezer*. Pada waktu akan digunakan dilakukan pencairan dengan suhu 37°C dalam waterbath (Ljungstrom et al,2004).

4.7.2.3.2 Preparasi Eritrosit Segar (*Red Blood Cells 50%*)

Tujuh ml darah segar (*whole blood*) golongan O ditransfer ke dalam tabung 15 ml. Ditambah medium M (+) dengan volume yang sama. Disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada suhu ruangan. Semua *buffy coat* dibuang dan endapan diresuspensi dalam Medium



(+) sebanyak-banyaknya. Selanjutnya disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar. Supernatan dibuang dan diresuspensi kembali dengan medium M (+) kemudian disentrifus 2000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar. Sedimen darah dikoleksi dan terakhir ditambahkan Medium Komplit 5%, sehingga didapatkan RBC 50 %. Disimpan pada 4° C, dapat digunakan sampai 1 minggu (Ljungstrom *et al*,2004).

4.7.2.3.3 Biakan Isolat *Plasmodium Falciparum* galur 3D7

Isolat *P.falciparum* galur 3D7 ditumbuhkan dalam medium RPMI-1640 yang mengandung 10% serum manusia tipe O (Medium komplit 10%) dan 5% hematokrit dengan metode Trager and Jensen (1976) (Ljungstrom *et al*,2004).

4.7.2.3.4 Sub-biakan *Plasmodium falciparum*

Jika biakan parasit mencapai parasitemia 5% dan assay belum dapat dilakukan maka perlu dilakukan sub-biakan dengan cara sebagai berikut: Suspensi biakan disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang dan resuspensi endapan dengan medium komplit 10 % dengan volume yang sama untuk membuat suspensi 50%. Bagi suspensi dalam botol yang baru dan ditambahkan sediaan eritrosit segar untuk membuat parasitemia 0,5 – 1 %. Terakhir ditambahkan medium komplit 10% untuk mendapatkan hematokrit sebesar 5 – 10 %.

4.7.2.3.5 Freezing *Plasmodium falciparum*

Suspensi biakan yang mengandung eritrosit terinfeksi parasit stadium cincin lebih besar dari 10% disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan diresuspensi



dengan larutan *freezing* sama banyak. Suspensi diletakkan dalam *small screw cap vials* dan segera masukkan pada freezer -20°C, -50°C, -70°C dan terakhir dalam larutan Nitrogen cair.

4.7.2.3.6 Thawing *Plasmodium falciparum* galur 3D7

Larutan Thawing dihangatkan pada *waterbath* 37°C. Isolat parasit diambil dari *liquid Nitrogen tank* dan diletakkan pada *Laminar air Flow*. Isolat ditransfer pada tabung sentrifus 15 ml. Pada suspensi parasit ditambahkan larutan NaCl 12% dalam PBS sebanyak 1/5 volume suspensi parasit tetes demi tetes, dibiarkan 5 menit. Ditambahkan larutan NaCl 1,6% dalam PBS pada suspensi parasit sebanyak 9 kali volume suspensi parasit tetes demi tetes dan kemudian dicampur secara perlahan. Suspensi disentrifus pada 2000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan pada endapan ditambahkan larutan 0,9% NaCl dalam PBS dan 0,2% glukosa sebanyak 9 kali volume endapan, tetes demi tetes dan kemudian dicampur secara perlahan. Suspensi disentrifus 2000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan diresuspensikan dengan medium komplit 15% sebanyak 10 ml dan ditransfer pada botol biakan (Ljungstrom *et al*,2004).

4.7.2.4 Pemberian Antibodi pada Kultur Eritrosit terinfeksi *P.falciparum* 3D7

Antibodi dilarutkan dalam PBS pada 100 µg/mL, kemudian ditambah 0,4 µL reagen Ab-DeliverIN pada satu mikrotube hingga volume larutan 20µL, dan total volume medium 120 µL. Lalu ditambahkan 4 µL antibody (100 µg/L ke reagen Ab-DeliverIN, lalu campurkan menggunakan pipet. Setelah diinkubasi 10-15 menit pada suhu ruang, ditambahkan lagi 20 µL medium serum-free ke campuran

antibody-Ab-DeliverIN, dipisahkan ke sel kultur pada medium kultur regular (dengan serum). Terakhir diinkubasi pada 37oC dalam incubator CO₂ kondisi standart. Antibodi proteasom dan Ab-DeliverIN yang telah dicampurkan, digunakan sesuai dosis pada 24-well plate.

4.7.2.5 Pemeriksaan Morfologi Parasitemia (Pengecatan Giemsa)

Kultur terinfeksi diambil dan dibuat hapusan pada gelas objek, ditunggu hingga kering dan diberi methanol hingga merata dan ditunggu kering. Hapusan dicat dengan giemsa yang merupakan campuran pulas giemsa dan buffer giemsa dengan rasio 1:4 selama 20 menit. Kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Parasitemia dilihat pada pembesaran 1000 x. Persentase parasitemia dihitung berdasarkan jumlah eritrosit terinfeksi malaria setiap 1000 eritrosit. Pengukuran parasitemia dilakukan setiap hari.

4.7.2.6 *Western blotting Ubiquitin*

Biakan sampel dicuci dengan PBS dan parasit diekstraksi dengan lisis saponin 0,15%. Pencucian selanjutnya dilakukan dalam PBS dilengkapi dengan 20 mM NEM, 0,05 mM EDTA, 1 mM AEBSF, 0,02% Natrium azida dan Protease Inhibitor. Protein yang diekstraksi dari pelet parasit melalui sonifikasi 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, 0,02% Na azida).

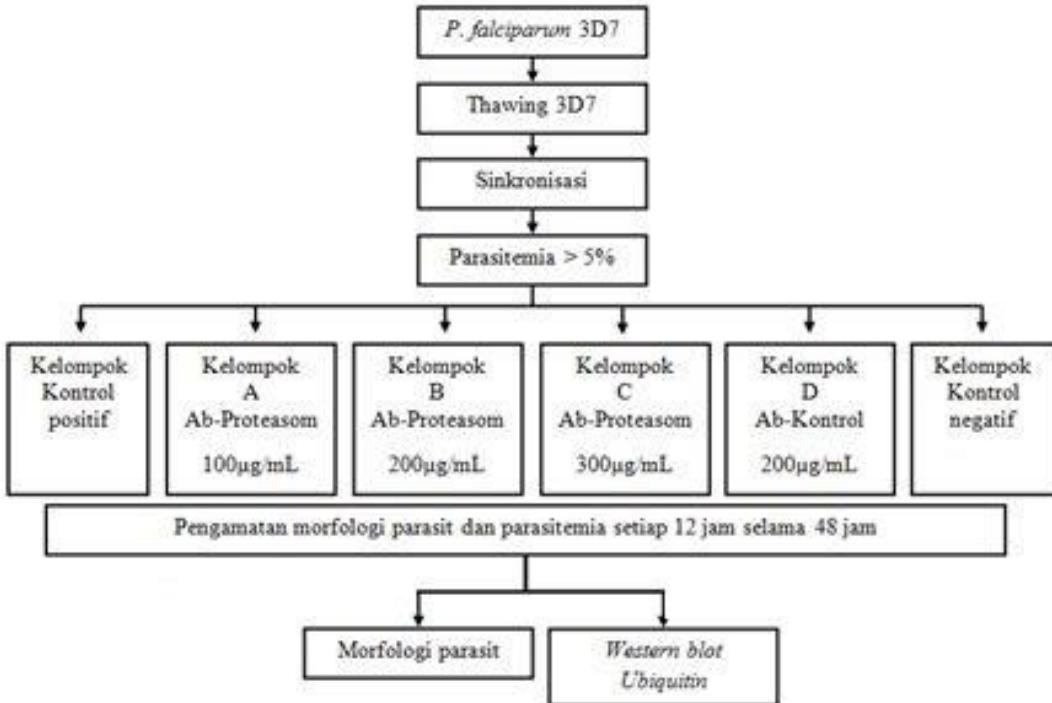
Protein dipisahkan dengan SDSPAGE dengan sel Mini Biorad Protean 3 dan ditransfer ke membran PVDF Invitrogen dengan Owl Panther semidry electroblotter. Bercak yang diperiksa dengan Upstate anti-*ubiquitin* antibodi poliklonal dan divisualisasikan dengan substrat Amersham ECL.



4.8 Metode Pengolahan Data dan Analisis

Analisis data yang dilakukan dengan SPSS 17, berupa uji normalitas, uji homogenitas, *oneway* ANOVA, uji *posthoc* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian