

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah memkai penelitian True Experimental lalu menggunakan *Post Test Only Group Design*. Secara sistematis dibagi menjadi 3 kelompok mencit penelitian yaitu:

- Kelompok 1: Mencit tidak bunting dan tidak diberi injeksi serum preeklampsia
- Kelompok 2: Mencit yang bunting dan tidak diberi injeksi serum preeklampsia
- Kelompok 3: Mencit yang bunting dan diberi injeksi serum preeklampsia berat

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi

Mencit Babl/c.

##### 4.2.2 Sampel

Mencit galur Babl/c sebanyak 18 ekor yang memenuhi kriteria inklusi.

#### 4.2.3 Tempat Penelitian

Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas kedokteran.

#### 4.2.4 Waktu Penelitian

November 2015 – Februari 2016.

### 4.3. Subjek Penelitian

#### 4.3.1 Pemilihan Sampel

Kriteria inklusi hewan coba mencit Babl/c: jenis kelamin betina, bunting, umur 3 bulan, berat badan antara 10-20 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat intake bahan antibodi apapun, dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif dan bulu tidak rontok.

#### 4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah mencit Babl/c yang diberi perlakuan injeksi serum Preeklampsia. Terdapat 3 kelompok yaitu:

- Kelompok kontrol I adalah mencit yang tidak bunting dan tidak diinjeksi serum preeklampsia.
- Kelompok kontrol II adalah mencit yang bunting dan diberi injeksi serum preeklampsia.
- Kelompok kontrol III adalah mencit yang bunting dan diberi injeksi serum preeklampsia.
- Perhitungan sampel akan diberikan rumus seperti dibawah ini

$$P(n-1) \geq 15 \text{ (Solimun, 2001)}$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$N \geq 6$$

Keterangan:

P=perlakuan

N=Jumlah sampel perlakuan

#### 4.4. Variabel Penelitian

##### 4.4.1. Variabel bebas

Injeksi serum preeklampsia sebanyak 0,1 cc pada mencit bunting.

##### 4.4.2. Variabel tergantung

Gambaran ekspresi TNF- $\alpha$  pada liver mencit bunting yang diinjeksi serum preeklampsia berat.

##### 4.4.3 Variabel Terkontrol

Umur kehamilan, mencit bunting.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Mencit: mencit Balb/c betina berumur 3 bulan yang bunting antara 100-200 gram.



2. Serum Preeklampsia berat yang telah tersedia dari Rumah Sakit Syaiful Anwar (RSSA) di bagian departemen obsteri dan ginekologi.
3. Injeksi serum Intraperitoneal: menginjeksi serum preeklampsia sebanyak 0,1 cc, mencit diinjeksi 2 kali pada usia kehamilan 10 dan 11 hari.

TNF- $\alpha$ : TNF- $\alpha$  adalah protein yang disebut juga sitokin pleiotropic yang berperan dalam system inflamasi, kemudian protein ini akan dinilai jumlahnya dalam bentuk ekspresi dengan metode immunohistokimia kemudian dilihat dan dihitung dibawah mikroskop lalu dihitung per lapang pandang.

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 bahan

- A. Hewan coba: Mencit putih Balb/c betina yang bunting dan tidak bunting
- B. Serum Preeklampsia berat yang telah tersedia.
- C. Antibodi: ekspresi TNF- $\alpha$  (santa cruz)
- D. Imonohistokimia kit (SERCA)
- E. PB5, PH 7,4, dh20, Mayer Hematoxylin, entelan.

##### 4.6.2 Alat

- Sentrifugator.
- Ruang penyimpanan mencit.
- Hecting set.
- Mikroskop Nikon e100.

- Sony ILCE 6000 camera mikroskop.
- Chamber IHC.
- Refrigerator.
- Micro pipette.

#### 4.6.3 Bahan Pengukuran Kadar Albumin

- Spektrofotometer HACH DR/2000
- Botol gelas bekas
- Cuvette
- Mikropipet
- Tip
- vorteks

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Membuntingkan Mencit

Mencit betina usia 16 minggu (sudah masa reproduksi) dipisahkan dari mencit jantan selama 2-3 minggu sehingga mencit betina berada dalam kondisi *unestrus* (efek Leeboot). Kemudian mencit betina diberikan bau mencit jantan selama 72 jam untuk memulai kembali siklus estrus (efek feromon). Mencit jantan dan betina dikawinkan dengan perbandingan (1:1) selama 1 malam (Fitri *et al*, 2015) dimulai pada jam 19.00 wib sampai jam 06.00 wib keesokan harinya.

#### 4.7.2 Injeksi Serum Preeklampsia

Injeksi serum preeklampsia secara intraperitoneal pada bagian lateral perut mencit menggunakan syring 1 cc dengan jarum yang tajam dan baru, sterilisasi menggunakan alkohol 70%, lalu menginjeksi serum preeklampsia yang telah tersedia sebanyak 0,1 cc, mencit diinjeksi 2 kali yaitu pada usia kehamilan 10 dan 11 hari.

#### 4.7.3 Pengelompokan Mencit

Mencit Balb/c betina di golongan menjadi 3 kelompok sesuai dengan pembagian kelompok sampel penelitian

#### 4.7.4 Metode Pemeriksaan Urin

Pengukuran total protein dalam urin memakai metode *colorimetric test pyrogallol red*. Pengukuran proteinuria dilakukan pada hari ke 11 dan hari ke-19 kehamilan. Sehari sebelum pengukuran, hewan coba ditempatkan pada botol gelas bekas dengan didiamkan untuk menampung urin 24 jam. Setelah urin terisi, mencit diambil untuk diukur tensi mencit, sampel hasil urin keseluruhan tertampung di lab biomedik, setelah tertampung kemudian hasil sampel urin tersebut diukur proteinuria menggunakan Spektrofotometer HACH DR/2000, setelah diukur catat hasil pengukuran proteinuria.



#### 4.7.5 Pembedahan Mencit

Pada usia 20 hari mencit dibedah sehingga dapat diambil darah dan organya untuk pengecekan variabel, mengacu penelitian yang dilakukan oleh Zho *et al.*, (2010)

#### 4.7.6 Pembuatan Histopatologi Liver Mencit

1. Pembuatan preparat menggunakan metode paraffin
2. Fiksasi: merendam formalin 10%
3. Pencucian dengan air minimal 1,5 jam
4. Dehidrasi: dilakukan secara bertahap agar tidak mengerut
5. Penjernihan: digunakan cairan ditahap dehidrasi tidak dapat bercampur dengan media impregnansi/blok
6. Parafinasi: bertujuan untuk meningkatkan kekerasan jaringan dalam rangka pemotongan setipis mungkin
7. Pengeblokan: bertujuan untuk membuat blok paraffin dengan jaringan yang akan dipotong didalamnya, dibiarkan sampai dingin lalu dikeluarkan dari cetaknya
8. Pemotongan blok paraffin: bertujuan untuk memotong jaringan sesuai dengan ketebalan yang diinginkan untuk membuat sediaan histologi.
9. Pemasangan pita sayatan ke gelas objek

#### 4.7.7 Pewarnaan Imunohistokimia Liver mencit

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan monoklonal anti Hsp90, selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan anti mouse HRP konjugai selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH7,4 tiga kali, selama 5 menit. Tetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Cuci menggunakan dH<sub>2</sub>O dan kering anginkan. Mounting menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass.

#### 4.7.8 Pengamatan Imunohistokimia Liver Mencit

Amati pada mikroskop cahaya (Soini Y *et al*, 1997). TNF- $\alpha$  dihitung dalam jumlah sel dihitung pada 20 lapang pandang berbeda, setelah dihitung kemudian dijumlah dan dibagi 20 agar mengetahui berapa rerata perlapang pandang. Perhitungan lapang pandangnya dengan pembesaran 1000x diamati di sitoplasma. (Soini *et al*, 1998; Pizem and Cor, 2003)

#### 4.8 Analisis Statistik

Untuk Mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan digunakan uji statistik *one way ANOVA*. Hasil yang diperoleh untuk menilai pengaruh



injeksi serum pasien preeklampsia secara intraperitoneal terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada liver mencit.

#### 4.9 Rancangan Operasional

injeksi serum preeklampsia 0,1 cc pada hari ke 10 dan 11 usia kehamilan mencit → amati kepada ketiga mencit yaitu:

- A. Mencit bunting
- B. Mencit bunting diinjeksi
- C. Mencit tidak bunting

Ukur tensi kepada tiga mencit dan ambil sampel urin pada hari ke 20 mencit

→ ukur kadar albumin urin dan serum ekspresif TNF- $\alpha$ .



