

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

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

4.2 Lokasi Penelitian

Laboratorium Parasitologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan parasit *Plasmodium berghei* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi 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 : 12-16 minggu
3. Berat badan mencit : 20-25 gram
4. Jenis kelamin mencit : betina

4.5 Estimasi Jumlah Sampel

Penelitian ini membagi sampel menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol adalah kelompok mencit tanpa diinokulasi *Plasmodium berghei* ANKA dan kelompok perlakuan adalah kelompok mencit dengan inokulasi *Plasmodium berghei* ANKA. Besar 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.

$$\begin{aligned} [(np-1)-(p-1)] &\geq 16 \\ [(2n-1)-(2-1)] &\geq 16 \\ 2n-1 &\geq 17 \\ 2n &\geq 18 \\ n &\geq 9 \end{aligned}$$

Dari rumus tersebut diperoleh ukuran sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok adalah 9, sehingga mencit yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 18 ekor. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *Simple Random Sampling*.

4.6. Identifikasi Variabel Penelitian

4.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah inokulasi *P. berghei*

4.6.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi HSP70 dan HMGB1 pada preparat ginjal mencit

4.6.3 Variabel Perancu

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. Infeksi *Plasmodium.berghei*

Mencit diinokulasi dengan 1×10^6 sel darah merah yang terinfeksi *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal pada semua kelompok mencit

2. Derajat parasitemia

Tingkat parasitemia adalah ditemukannya parasit malaria dalam darah (eritrosit), dihitung dalam 1000 eritrosit. Penilaian derajat parasitemia dilakukan pada setiap kelompok mencit setiap hari mulai hari ke-1 sampai hari ke-14 setelah inokulasi.

3. Kriteria malaria berat pada ginjal

Kriteria untuk menilai kerusakan ginjal pada malaria berat pada penelitian ini menggunakan skor variabel histopatologi glomerulus. Metode skoring perubahan histopatologis pada ginjal ditentukan menurut metode Klopffleisch (2013). Gambaran kerusakan histopatologis pada glomerulus ginjal meliputi nekrosis glomerulus, infiltrasi sel radang, proliferasi mesangial dan sklerosis glomerular (Klopffleisch, 2013).

3. Ekspresi protein HSP70 dan HMGB1 pada jaringan ginjal mencit

Ekspresi protein HSP70 dan HMGB1 pada jaringan ginjal mencit adalah ekspresi protein HSP70 dan HMGB1 yang diperiksa dengan metode pengecatan imunohistokimia pada ginjal dari setiap kelompok mencit menggunakan antibodi monoklonal terhadap HSP70 dan HMGB1. Antibodi monoklonal terhadap HSP70 didapat dari *Stressmarq Biosciences, Inc.* dengan nomor katalog HSP70 2A4: SMC-163 dan antibodi monoklonal terhadap HMGB 1 didapat dari *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* dengan nomor katalog HMG-1 (J2E1): sc-135809. Protein HSP70 dan HMGB1 tercat sebagai warna coklat dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000x.

4. Pemeriksaan histopatologis untuk mengetahui kerusakan glomerulus

Gambaran kerusakan histopatologis pada glomerulus ginjal meliputi nekrosis glomerulus, infiltrasi sel radang, proliferasi mesangial dan sklerosis glomerular. Metode skoring perubahan histopatologis pada ginjal ditentukan menurut metode Klopffleisch (2013). Adapun bentuk-bentuk lesi histopatologis glomerulus yang diamati sebagai berikut :

Tabel 4.1 Pengukuran skor variabel histopatologi nekrosis glomerular (Klopffleisch, 2013)

Skor	Keterangan
0 (nol)	tidak terjadi perubahan nekrosis pada sel glomerular
3 (tiga)	nekrosis glomerular < 25% dari seluruh Glomerulus
5 (lima)	nekrosis glomerular 26–50% dari seluruh Glomerulus
7 (tujuh)	nekrosis glomerular 51 – 75% dari seluruh Glomerulus
9(sembilan)	nekrosis glomerular >76 dari seluruh Glomerulus

Tabel 4.2 Pengukuran skor variabel histopatologi infiltrasi glomerular (Klopfleisch, 2013)

Skor	Keterangan
0 (nol)	tidak ditemukan sel radang pada glomerulus
1 (satu)	ditemukan sel radang pada < 25% dari seluruh glomerulus
2 (dua)	ditemukan sel radang pada 26–50% dari seluruh glomerulus
3 (tiga)	ditemukan sel radang pada 51 – 75% dari seluruh glomerulus
4 (empat)	ditemukan sel radang pada >76 dari seluruh glomerulus

Tabel 4.3 Pengukuran skor variabel histopatologi *Mesangial proliferasi* dan atau *hyalination (glomerular sclerosis)* (Klopfleisch, 2013)

Skor	Keterangan
0 (nol)	tidak terjadi proliferasi dan atau sclerosis glomerular
1 (satu)	proliferasi/sclerosis glomerular < 25% dari seluruh glomerulus
2 (dua)	proliferasi /sclerosis glomerular 26–50% dari seluruh glomerulus
3 (tiga)	proliferasi /sclerosis glomerular 51 – 75% dari seluruh glomerulus
4(empat)	proliferasi /sclerosis glomerular >76 dari seluruh glomerulus

Nilai skoring derajat kerusakan pada setiap sampel merupakan jumlah rata-rata dari semua jenis lesi yang terjadi pada 5 lapang pandang berbeda pada glomerulus. Seluruh pengamatan menggunakan mikroskop cahaya merk *Nikon Eclipse Ci* yang dilengkapi dengan *Digital Camera Optilab Plus 12 Megapixel* yang telah dikalibrasi, serta dilengkapi dengan *software* pengolah gambar *Image Raster 3*. Penelitian tentang histopatologi kerusakan gromerulus ini telah dilakukan oleh peneliti lain di dalam pohon penelitian yang sama (Rahmawati, 2014).

4.8. Rancangan (Desain Penelitian)

Desain Penelitian ini adalah *Randomized Controlled Trial* (RCT) dengan variasi *Completely Randomized Experiment Design*.

4.9 Alat dan Bahan Penelitian

4.9.1 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 khusus yang sudah disterilisasi, sekam, timbangan berat badan dengan neraca mencit.

4.9.2 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^+ , *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA), kapas, alkohol, larutan giemsa, metanol p.a., dan buffer giemsa.

4.9.3 Pengukuran Derajat Parasitemia

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

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

4.9.4 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%.

4.9.5 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.

4.9.6 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%, H₂O₂, metanol, aquades, larutan diva, dan larutan *universal decloaker*.

4.9.7 Immunohistokimia

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

Bahan : antiidi primer monoklonal HSP70 dan HMGB1, larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 5%, *Strep Avidin-Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP), Diamono Benzidine (DAB), H₂O₂ 3%, Mayer Hematoksilin, dan antibodi sekunder.

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Pemeliharaan mencit

Mencit diperoleh dari Institut Eijkman Jakarta. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur C57BL/6J. 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 C57BL/6J karena galur ini adalah model yang baik dalam memperagakan status umum terhadap malaria, khususnya malaria berat dengan kerusakan ginjal.

Selama masa pemeliharaan, kedua kelompok mencit mendapatkan perlakuan yang sama. Pada kelompok I (kelompok perlakuan) dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei* sedangkan pada kelompok II (kelompok kontrol) tidak dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei*. Semua kelompok mencit selama penelitian mendapatkan pakan khusus dari Institut Eijkman Jakarta.

4.10.2 Inokulasi *Plasmodium berghei* galur ANKA

Inokulasi *Plasmodium berghei* galur ANKA untuk mencit donor dilakukan dengan menginokulasikan *Plasmodium 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 dilakukan secara intraperitoneal sebanyak 10^6 parasit dalam 0.2 ml darah untuk tiap mencit. 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 μ 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 1×10^6 /ml darah, sehingga pengenceran yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah parasit tersebut adalah jumlah parasit/ 1×10^6 (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⁺ untuk mendapatkan konsentrasi parasit 10^6 dalam 0.2 ml darah, kemudian larutan tersebut ditransfer secara intraperitoneal ke mencit perlakuan sebanyak 0.2 ml.

4.10.3 Pengukuran Derajat Parasitemia

Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis. Darah tersebut diambil dari ujung ekor mencit dengan menggunting sedikit ujung ekor mencit lalu ditetaskan ke *object glass*. Tetesan darah tersebut kemudian dibuat hapusan dengan menggunakan *object glass* lainnya dengan sudut 45⁰. 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 (Moll *et al.*, 2008).

4.10.4 Pembedahan Mencit

Setelah perlakuan hari ke-14, mencit dibedah untuk diambil organ ginjalnya. 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 steroform, 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. Lebar insisi ke arah rongga thoraks dengan menggunakan gunting bedah. Organ ginjal mencit diambil dengan menggunakan pinset. Kemudian ginjal disimpan dalam botol jaringan dengan menggunakan formalin 10% sebagai fiksator. Mencit yang sudah dibedah selanjutnya dikuburkan di dalam tanah (Thiberge *et al.*, 2007).

4.10.5 Pembuatan Spesimen Histopatologi Ginjal

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 ginjal dikeluarkan dari inkubator dan diberi tambahan parafin cair. Saat parafin mengeras, telah didapatkan blok parafin berisi sampel ginjal.

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 μm . Setelah dilekatkan pada kaca benda (*object glass*), irisan dapat diwarnai dengan pewarnaan *hematoksin-eosin*. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entelan dan ditutup menggunakan *cover glass*.

4.10.6 Deparafinisasi

Sebelum dilakukan pewarnaan immunohistokimia, 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 ke dalam 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 H_2O_2 , metanol, dan aquades selama 20 menit. Larutan campuran tersebut terdiri dari 5 ml metanol dan 1,6 ml H_2O_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 95⁰. Tutup alat *decloaking chamber* baru dapat dibuka bila suhu sudah turun secara otomatis mencapai dibawah 90⁰.

4.10.7 Prosedur 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% H₂O₂ dalam metanol dan inkubasi selama 15 sampai dengan 20 menit. Jika larutan campuran H₂O₂ dan metanol yang akan digunakan sebanyak 1000 mikroliter, reagen H₂O₂ 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 HSP70 dan HMGB1 dengan konsentrasi 1:50. Kemudian slide dinkubasi selama satu malam dalam suhu 4⁰C. 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 imunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop.

4.10.8 Pengamatan Ekspresi HSP70 dan HMGB1

Ekspresi HSP70 akan terlihat berwarna coklat pada sitoplasma sel tubular dan glomerular, sedangkan HMGB1 akan diekspresikan berwarna coklat pada sel tubular, glomerular, intersisial, dan endotel. Slide diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dengan emersi, lalu diamati 20

lapangan pandang pada tiap slide. Setelah semua slide dihitung maka akan dirata-rata jumlah ekspresinya baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan (O'Neill *et al.*, 2014) (Zickert *et al.*, 2012).

4.11 Prosedur Pengumpulan dan Analisa Data

4.11.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Hari ke-1 setelah diinokulasi *Plasmodium berghei*, setiap hari dilakukan pengamatan derajat parasitemia pada mencit.
- b. Preparat yang telah tercatat diamati secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x menggunakan *oil immersion* dan dihitung jumlah sel yang terekspresi HSP70 dan HMGB1.

4.11.2 Analisa Data

Dari data pengamatan dan pengukuran dilakukan analisa secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS 22.0 for Windows 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 *Mann-Whitney*, dan uji korelasi *Spearman*. Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk membandingkan perbedaan antara ekspresi HSP70 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol serta membandingkan perbedaan antara ekspresi HMGB1 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil uji statistik signifikan jika nilai $p < 0.05$. Uji Korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui korelasi antara ekspresi HSP70 dan HMGB1.

4.12 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.

4.13. Prosedur penelitian

