

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Bahan Biologik Tersimpan (BBT) jaringan plasenta dimana sebelumnya telah dilakukan penelitian experimental dengan metode *Post Test Control Design* oleh Gondo (2016). Bahan Biologik Tersimpan (BBT) yang digunakan pada penelitian ini berupa jaringan plasenta yang telah dibuat blok parafin, yang kemudian di lihat ekspresi *Malondehide* (MDA) dan *Interferon Gamma (INF- γ)* baik kelompok yang diberi *Phycocyanin* maupun yang tidak diberi *Phycocyanin*.

Pada penelitian ini untuk mendapatkan model tikus putih preeklampsia dengan usia kebuntingan yang sama, maka sebelum tikus dikawinkan dilakukan sinkronisasi siklus estrus. Sinkronisasi siklus estrus dilakukan melalui 3 tahap meliputi *Lee Both Effect*, *Pheromone effect*, *Whitten Effect*. Yang pertama yaitu dilakukan Lee Both Effect dimana tikus betina dijauhkan dari tikus jantan selama 2 minggu dan dikumpulkan dengan tikus betina yang lain untuk membuat kondisi unestrus. Kedua dilakukan Pheromone Effect yaitu tikus betina yang sudah dipisahkan dengan tikus jantan selama 2 minggu dikondisikan siklus estrusnya dengan dibangkitkan birahinya, caranya dengan memberikan paparan sekam bekas urin tikus jantan dikandang tikus betina. Terakhir yaitu *Whitten effect*, setelah dilakukan *Pheromon effect* dalam 72 jam tikus akan mengalami kondisi estrus. Kemudian tikus dikawinkan selama semalam dan keesokan harinya dianggap hari-1 kebuntingan. Setelah didapatkan 30 ekor tikus bunting kemudian dibagi menjadi 6 kelompok dimana 25 dari 30 ekor akan diinduksi dengan IL-6 dosis 5 ng/100 gram BB melalui vena ekor selama 5 hari yang dimulai pada hari ke-10 kebuntingan untuk mendapatkan model tikus preeklampsia. IL-6 yang

digunakan merupakan sitokin pro inflamasi dalam bentuk lyophilized yang diperoleh dari Bioss Inc, USA, No catalog :bs-0003R. Bersamaan dengan induksi IL-6 diberikan *Phycocyanin* dalam bentuk powder yang telah diencerkan dengan 0,5 % Na-CMC sebagai emulsifier sehingga serbuk C-Phycocyanin akan terlarut homogen, *Phycocyanin* yang diberikan ini dipesan dari sigma aldrich Singapura kode produk P20711, yang diberikan dengan dosis 10, 20, 40, 80 ng/100 gram BB per oral (sonde) selama 5 hari. Untuk memastikan bahwa tikus sudah mengalami preeklampsia maka dilakukan pemeriksaan tekanan darah dan protein urin, dimana tekanan darah pada model tikus preeklampsia meningkat 25-30 mmHg (sistole dan diastole), sedangkan protein urin meningkat lebih dari 2 g/L. Tekanan darah kemudian diukur dengan alat blood pressure analyzer merk Kent Scientific CODA, tekanan darah (sistole dan diastole) diukur sebanyak 3x kemudian diambil reratanya (Gondo, 2016).

4.2 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian adalah bulan Juli 2017

4.3 Sampel penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel penelitian berupa blok parafin yang berisi jaringan plasenta sejumlah 30 blok parafin dengan rincian sebagai berikut :

Tabel 4.1 Kelompok sampel penelitian

Kelompok	Perlakuan pada jaringan hewan coba dan di masing-masing blok parafin	Jumlah jaringan plasenta tikus (blok parafin)
Kontrol negatif (N)	Tanpa diinduksi IL-6 dan tanpa diberikan phycoyanin	5
Kontrol positif (K)	Diinduksi IL-6 dosis 5 ng/hari selama 5 hari	5
Perlakuan 1 (P1)	Diinduksi IL-6 dosis 5 ng/hari + phycoyanin dosis 10 ng selama 5 hari	5
Perlakuan 2 (P2)	Diinduksi IL-6 dosis 5 ng/hari + phycoyanin dosis 20 ng selama 5 hari	5
Perlakuan 3 (P3)	Diinduksi IL-6 dosis 5 ng/hari + phycoyanin dosis 40 ng selama 5 hari	5
Perlakuan 4 (P4)	Diinduksi IL-6 dosis 5 ng/hari + phycoyanin dosis 80 ng selama 5 hari	5

4.3.1 Kriteria Sampel

1) Kriteria inklusi

Blok parafin yang berisi jaringan plasenta dan dalam kondisi baik

2) Kriteria eksklusi

Blok parafin yang rusak dan tidak memungkinkan untuk dilakukan penelitian

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan

- a. Blok parafin berisi jaringan plasenta
- b. PE anti-rat INF- γ produk dari Biolegend , No catalog : 507806
- c. Pewarnaan Dapi (biru) untuk inti sel
- d. TBARS Assay Kit merk Chayman Chemical No. 10009055
- e. Pewarnaan Rodhamin (merah) untuk sitoplasma
- f. Slide dan tempatnya

4.4.2 Alat

- a. Mikroskop olympus

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Dosis *Phycocyanin*

4.5.2 Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)

Malondehyde (MDA), *Interferon Gamma* (INF- γ)

4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Pengukuran/ metode	Alat Ukur	Data
<i>Phycocyanin</i>	<i>Phycocyanin</i> dalam bentuk serbuk yang dari sigma aldrich Singapura kode produk P20711.	<i>Phycocyanin</i> dilarutkan dengan aqudest dan emulser sampai volume 100cc, sehingga diperoleh kadar dosis <i>Spirulina</i> sebesar 5 ng/0,1ml.	-	Numerik
Ekspresi <i>Malondehyde</i> (MDA)	Ekspresi <i>Malondehyde</i> (MDA) dalam jaringan plasenta yang diukur dengan menggunakan kit merk Cayman Chemical No. 10009055	Diukur dengan metode pewarnaan TBARS dan dianalisis dengan immunoflourence	Mikroskop olympus	Numerik
Ekspresi Interferon Gamma (INF- γ)	Ekspresi <i>Interferon Gamma</i> (INF- γ) dalam jaringan plasenta yang diukur dengan menggunakan immunoflouresen	Pemeriksaan menggunakan Immunofluorecen	Mikroskop olympus	Numerik

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeriksaan Ekspresi *Malondehyde* (MDA)

Pemeriksaan *ImunoFluoresen* MDA

Setelah preparat slide telah dipersiapkan, maka dilakukan tahap selanjutnya yaitu pengecatan imunofluorensi. Tahapan pengecatan, sebagai berikut :

1. Reagen menutup seluruh permukaan spesimen (sekitar 1-5 ml per-slide memadai).

2. Inkubasi spesimen dengan 10% serum yang normal *blocking* (Sera normal untuk Imunohistokimia) di *Phosphate Buffered Saline* (PBS), merupakan buffer dan umum solusi selama 20 menit.
3. Inkubasi preparat dengan antibodi primer (Antibodi Trofoblas) selama 60 menit. Konsentrasi antibodi yang digunakan adalah 0,5-5,0 mg/ml di PBS 1,5%.
4. Cuci tiga kali dengan cairan PBS selama 5 menit setiap tahap pencucian.
5. Inkubasi selama 45 menit dengan baik biotin-terkonjugasi atau antibodi sekunder *fluorochrome-terkonjugasi*, diencerkan ke 1-5 ug/ml dalam PBS dengan 1,5%.
6. Inkubasi dengan *streptavidin-fluorescein* selama 15 menit dalam ruang gelap, kemudian cuci secara menyeluruh dengan PBS.
7. Pasang *coverslip* dengan gliserol 90% di PBS
8. Masukkan ke mikroskop *imunofluorence* dengan pembesaran 200x dan 3 lapang pandang.
9. Out put ekspresi variabel dibaca dalam bentuk angka dan dianalisa melalui *software*

4.7.2 Pemeriksaan Ekspresi *Interferon Gamma (INF- γ)*

Preparat slide telah dipersiapkan, maka dilakukan tahap selanjutnya yaitu pengecatan imunofluorensi. Tahapan pengecatan, sebagai berikut :

1. Reagen menutup seluruh permukaan spesimen (sekitar 1-5 ml per-slide memadai).
2. Inkubasi spesimen dengan 10% serum yang normal *blocking* (Sera normal untuk Imunohistokimia) di *Phosphate Buffered Saline* (PBS), merupakan buffer dan umum solusi selama 20 menit.

3. Inkubasi preparat dengan PE anti rat selama 60 menit.
4. Cuci tiga kali dengan cairan PBS selama 5 menit setiap tahap pencucian.
5. Pasang *coverslip* dengan gliserol 90% di PBS
6. Masukkan ke mikroskop *imunofluorence* untuk dibaca atau dievaluasi.
Pada metode yang dipakai penelitian ini pendaran warna yang dihasilkan berwarna merah pada sitoplasma dan berwarna biru pada inti sel.
7. Out put ekspresi variabel dibaca dalam bentuk angka dan dianalisa melalui *software*

4.8 Analisis Statistik

Data yang sudah terkumpul dianalisa menggunakan uji statistik dengan langkah sebagai berikut :

1) Uji normalitas

Bertujuan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk karena sampel < 50.

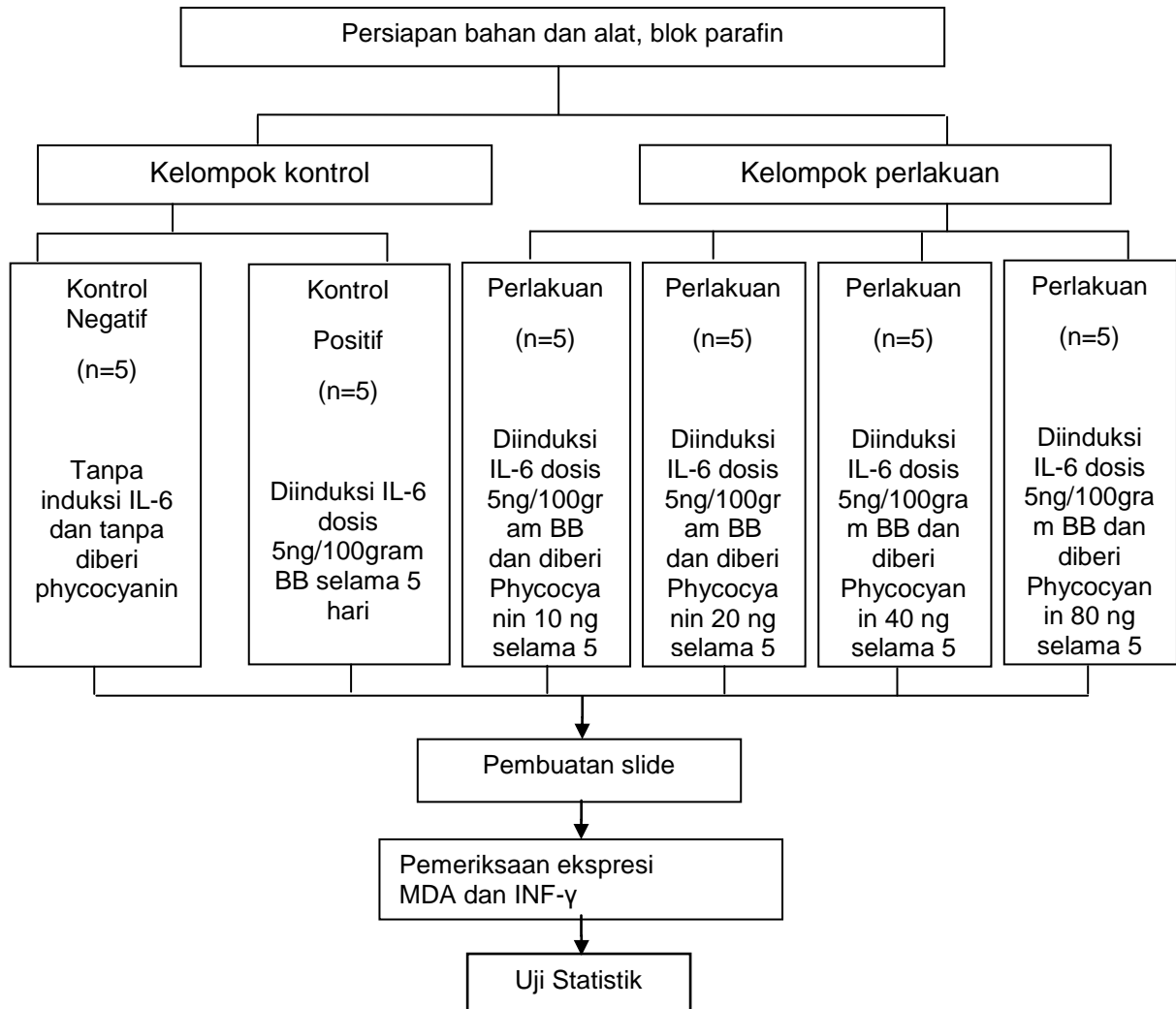
2) Uji homogenitas

Uji homogenitas dengan Levene's test

3) Uji komparasi

Uji komparasi menggunakan *One Way Anova* untuk menguji hipotesis. Kemudian uji LSD (*Least Significant Different test*) untuk menguji efek perlakuan.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.9 Bagan Alur Penelitian