

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Control Group Post Test Design adalah desain yang digunakan dalam jenis penelitian ini yaitu eksperimental laboratorik. Metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) digunakan untuk memilih objek penelitian terkait pengelompokan dan pengukuran, dikarenakan kultur sel trofoblas bersifat homogen. Prosedur penelitian yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada rancangan yang telah dilakukan sebelumnya oleh peneliti bernama Harry K. Gondo. (2022)

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April 2023 di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Jaringan plasenta normal diperoleh dari Rumah Sakit Siloam di Surabaya yang didapatkan melalui persalinan sectio caessarria atas persetujuan pasien.

C. Sampel

Sampel pada penelitian ini menggunakan sel trofoblas yang didapatkan dari jaringan plasenta normal melalui persalinan sectio caessaria atas persetujuan pasien. Plasenta normal diperoleh dari Rumah Sakit swasta di Surabaya yang didapatkan melalui persalinan sectio caessarria atas persetujuan pasien. Pada pengambilan sampel plasenta untuk proses selanjutnya dibawa ke laboratorium, diperlukan media transport agar sel trofoblas tetap hidup.

Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu Phosphate Buffered Saline (PBS). Kemudian dilakukan kultur sel trofoblas dan dibagi menjadi 6 kelompok, diantaranya :

K- : Kontrol negatif (tanpa diinduksi glukosa)

K+ : Kontrol positif (diinduksi glukosa dosis 33 mM) pada hari ke 3

D. 1 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,1 mg/ml setelah Kultur primer sel trofoblas yang telah konfluen setelah 3 hari berturut-turut.

D. 2 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,2 mg/ml

D. 3 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,4 mg/ml

D. 4 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,8 mg/ml

Selanjutnya setiap perlakuan dikultur dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37°C selama 3 hari dan setiap kelompok diulang sebanyak 5 kali

D. Variabel Penelitian

Variable bebas: dosis ekstrak buah Pare

Variable terikat: kadar SOD

E. Definisi Operasional

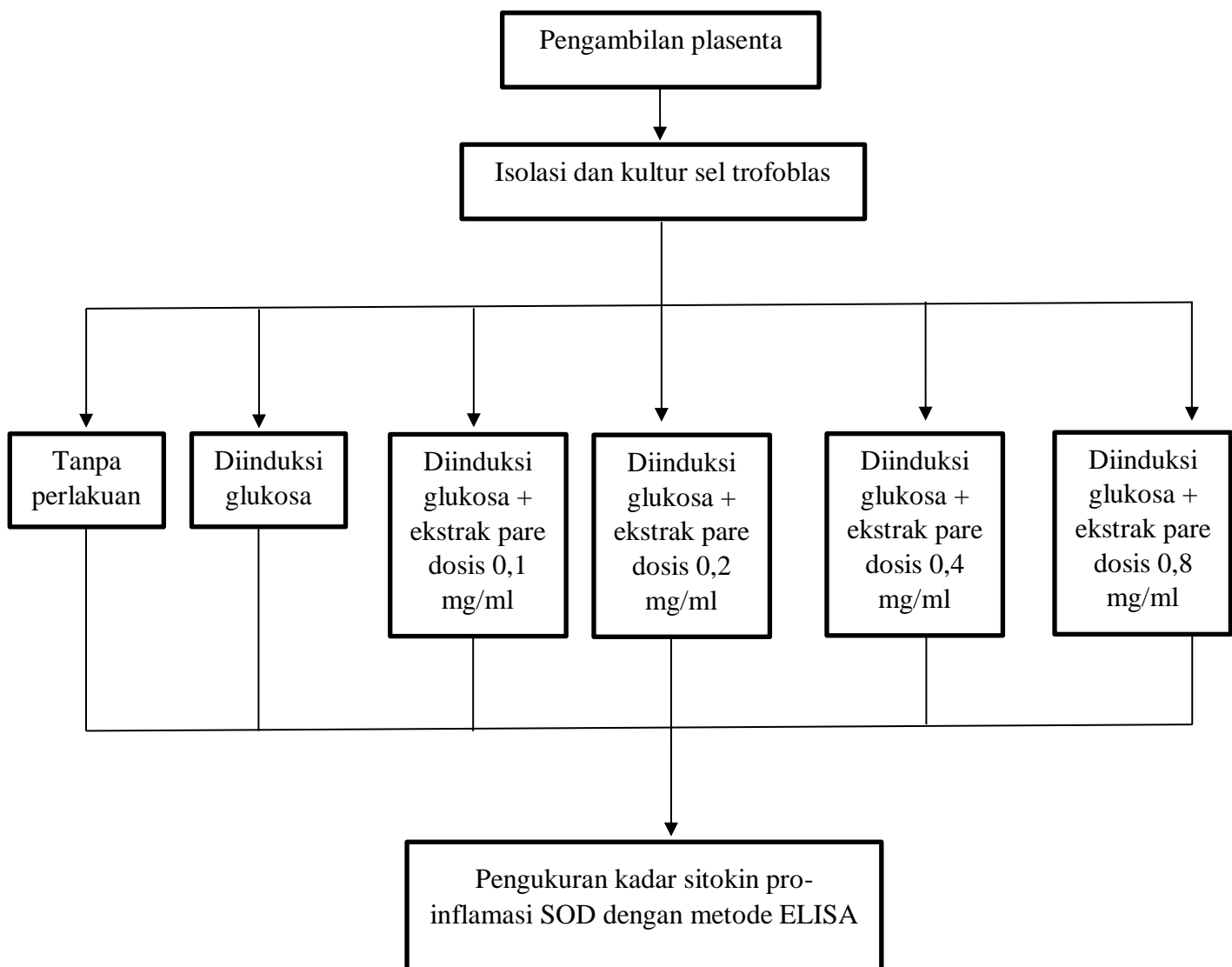
Tabel IV.1: Definisi operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Skala
1	Isolasi dan Kultur sel trofoblas	<p>Langkah langkah isolasi dan pembiakan sel trofoblas manusia. Dibagi menjadi 3 langkah,</p> <ul style="list-style-type: none">• Plasenta dibersihkan dari pembuluh darah dan jaringan fibrous, diambil bagian vilous sekitar satu kotiledon \pm 50 gram. Jaringan dicuci dengan larutan PBS sebanyak 3kali, dicacah kemudian dilakukan pemisahan sel trofoblast.• Preparat yang sudah disentrifuse, diambil larutan supernatant atau peletnya.• Sel-sel trofoblas diperoleh dengan pipet Pasteur diberikan cairan Percoll untuk menentukan jumlah sel trofoblas.	Mikroskop cahaya	Nominal
2	Glukosa dan Dosis ekstrak buah pare	<ul style="list-style-type: none">• Sel trofoblas di induksi glukosa supaya terjadi suasana hiperglikemi. Dilakukan kultur sel trofoblas dan kemudian dikelompokkan menjadi 6 kelompok, diantaranya kelompok kontrol negatif tanpa kondisi hiperglikemia, kontrol positif dengan kondisi hiperglikemia, kontrol perlakuan 1, 2, 3, dan 4 dengan perlakuan pemberian terapi ekstrak buah pare diberi ekstrak buah pare dosis 0,4 mg/ml	Timbangan digital	Nominal
3	Kadar SOD	Kadar SOD darah yang diambil melalui tusukan plasenta \pm 3 mL yang kemudian akan disentrifugasi	ELISA reader	Rasio

		untuk didapatkan serum yang selanjutnya akan diperiksa kadar SOD dengan metode ELISA		
--	--	--	--	--

F. Prosedur Penelitian

1. Langkah-langkah penelitian



Gambar IV.1 Alur Penelitian Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pare terhadap Kadar SOD pada Kultur Sel Trofoblas Suasana Hiperglikemia

a) Isolasi dan Kultur Sel Trofoblas

Untuk mendapatkan sel trofoblas dari plasenta, maka plasenta manusia diambil semua. Bagian plasenta yang diambil adalah bagian basal plasenta, yaitu permukaan pertemuan plasenta dengan dinding rahim (*maternal fetal interface surface*).

- 1) Siapkan sebotol larutan *cord solution* dari kulkas (suhu 4°C). Plasenta segera dikeluarkan setelah lahir lalu dipotong dan dimasukkan ke dalam larutan *cord solution*.
- 2) Pada pengambilan sampel plasenta untuk dibawa ke laboratorium, diperlukan media transport agar sel trofoblas tetap hidup. Beberapa media dapat digunakan sebagai media, misal : Dispase diproduksi oleh Roche, DNase, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), dll. Pada penelitian ini media transport menggunakan PBS (Zivkovic, 2011).
- 3) Bagian bawah pelat kultur 6 sebelumnya ditutup dengan kaca penutup yang sesuai, ditetesi 0,5-1 ml gelatin (0,2%), dan diinkubasi selama 30-60 menit.
- 4) Dalam cawan petri, jaringan plasenta dicuci dengan PBS-A (PBS-A) steril pH 7,4 dengan antibiotik pen-strep sampai tidak ada darah.
- 5) Jaringan diiris menjadi 2mm³, dicuci dengan PBSA steril pH 7,4 dengan pen-strep, dipipet, dan disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit.
- 6) Supernatan dibuang, dan pelet I dipipet dan disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit dalam media biakan bebas serum (M-199 + penstrep).
- 7) Supernatan dibuang, dan pelet II disuspensikan kembali dalam media biakan yang mengandung serum (M-199 + pen-strep + 10% FBS). 500L jaringan ditempatkan di

piring kultur 6-sumur dan dikultur selama 30 menit pada suhu 37 ° C dalam inkubator CO₂ 5%. 1,5 ml media M-199 dengan 10% FBS ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5%. Setelah 24 jam, media pertumbuhan diganti dengan M-199 + 10% FBS, dan sel dikultur dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 3 hari sebelum dikumpulkan.

Setelah diperoleh isolasi yang masih belum benar – benar hanya terdiri sel trofoblas, maka untuk mengeliminasi dari jaringan lainnya dilakukan inkubasi preparat dengan menambahkan 20 µm anti-fibroblasts Dynabeads selama 10 menit. Maka setelah itu kemudian diperoleh preparat yang hanya mengandung sel sel trofoblas. Setelah itu maka dilakukan pembiakan sel trofoblas.

b) Pemberian glukosa dan dosis ekstrak buah pare

Pemberian glukosa sebagai model eksperimental kejadian GDM. Kultur primer sel trofoblas yang telah konfluen setelah 3 hari dikelompokkan menjadi 6 kelompok, diantaranya kelompok kontrol negatif tanpa kondisi hiperglikemia, kontrol positif dengan kondisi hiperglikemia, kontrol perlakuan 1; 2; 3 dan 4 dengan perlakuan pemberian terapi ekstrak buah pare dengan dosis seperti berikut:

K- : Kontrol negatif (tanpa diinduksi glukosa)

K+ : Kontrol positif (diinduksi glukosa dosis 33 mM) pada hari ke 3

Dosis 1 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,1 mg/ml

Dosis 2 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,2 mg/ml

Dosis 3 : Diinduksi aloksan glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,4 mg/ml

Dosis 4 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,8 mg/ml

Perlakuan kemudian dikultivasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 3 hari, dengan masing-masing kelompok diulang sebanyak 5 kali.

c) Pengukuran data

Pengukuran kadar SOD pada penelitian ini menggunakan metode ELISA. Metode yang digunakan adalah double staining Imunofluoresen dengan pembacaan 3 lapang dengan perbesaran 1000x pandang plasenta. Software imunoflow 7.00 Olympus menggunakan alat ukur Mikroskop Konvocal type FX 81.

2. Kualifikasi dan jumlah tenaga yang terlibat dalam pengumpulan data

Tabel IV.2: Kualifikasi dan Jumlah Tenaga yang Terlibat dalam Pengumpulan Data

NO.	KUALIFIKASI	JUMLAH
1.	Peneliti	1
2.	Asisten Peneliti	1

Keterangan:

1. Peneliti: Maharani Sunarno Putri, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

2. Asisten Peneliti: Staff Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3. Pengumpulan data

a) Prosedur pengumpulan data

Sumber data yang diambil pada penelitian ini adalah data primer yang dilakukan pada eksperimen di laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

B) Jadwal waktu pengumpulan data

Tabel IV.3: Jadwal Waktu Pengumpulan Data

NO.	KEGIATAN	MINGGU													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	ISOLASI														
2	KULTUR SEL TROFOBLAS														
3	PERLAKUAN														
4	PENGUMPULAN DATA														
5	HASIL DAN PEMBAHASAN														

4. Bahan, alat, dan instrumen yang digunakan

a) Alat

- ELISA
- Inkubator

b) Bahan

- Plasenta
- Gelatin
- Larutan standar
- Larutan sampel
- Larutan *streptavidin*-HRP
- PBS-A (phosphate buffer saline A)
- Reagen
- Larutan stop solution
- Wash buffer

G. Metode Analisis Data

Uji One Way Anova digunakan untuk menganalisis data dalam penelitian ini. Uji tersebut digunakan untuk membedakan antara satu kelompok perlakuan dengan kelompok perlakuan lainnya, dengan perbedaan bermakna jika nilai p lebih kecil dari (0,05).

H. Etika Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan berpedoman etis dan norma demi menjamin privasi dari pasien. Hal ini berdasarkan atas persetujuan pengambilan plasenta secara tertulis (

informed consent) dari ibu atau sample setelah melewati persalinan section caessarea dengan memberikan penjelasan dan maksud tujuan dari penggunaan Plasenta sebagai sampel penelitian.