

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan menggunakan desain penelitian *Control Group Post Test Design*. Pemilihan obyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL ( Rancangan Acak Lengkap ). Hal ini disebabkan kultur sel trofoblas bersifat homogen. Rancangan penelitian masing - masing perlakuan yang dilakukan pada penelitian ini mengikuti prosedur yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya Harry K. Gondo, (2022) dalam judul Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pare Pada Kultur Sel Trofoblas Suasana Hiperglikemia Pada Jalur Inflamasi .

#### B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April 2023 di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya , Malang . Jaringan plasenta normal diperoleh dari Rumah Sakit swasta 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 caessarria* atas persetujuan pasien dari Rumah Sakit swasta di Surabaya. Sel trofoblas sebagai sampel yang diperoleh dari plasenta selaku epitel pengolah membran sel yang menjadi perantara

antara ibu dan janin serta sebagai penyuplai oksigen dan nutrisi. 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 CO<sub>2</sub> 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 : Apoptosis

## E. Definisi Operasional

Tabel IV.1 Definisi Operasional

| No | Variabel                                | Definisi Operasional   | Alat ukur        | Skala Data |
|----|---|--|------------------|------------|
| 1  | <b>Kultur dan isolasi Sel Trofoblas</b> | <p>Langkah langkah isolasi dan pembiakan sel trofoblas manusia . Dibagi menjadi 3 langkah;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Membersihkan plasenta dari pembuluh darah dan jaringan fibrous , mengambil bagian vilous sekitar satu kotiledon <math>\pm</math> 50 gram. Jaringan dicuci dengan larutan PBS sebanyak 3 kali, dicacah kemudian dilakukan pemisahan sel trofoblas.</li> </ul> | Mikroskop cahaya | Nominal    |

|   |                |  |                   |         |
|---|----------------|--|-------------------|---------|
|   |                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparat yang sudah disentrifuse, diambil larutan supernatant atau peletnya.</li> <li>• Sel sel trofoblas diperoleh dengan pipet pasteur diberikan cairan percoll untuk menentukan jumlah sel trofoblas ( Gondo , 2022 )</li> </ul> |                   |         |
| 2 | <b>Glukosa</b> | <p>Pemberian glukosa sebagai model eksperimental kejadian DMG dengan kultur primer sel trofoblas yang telah konfluen setelah 3 hari dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Induksi glukosa dilakukan agar plasenta dalam suasana Hiperglikemia.</p>                               | Timbangan digital | Nominal |

|   |  |   |                   |         |
|---|--|---|-------------------|---------|
| 3 | <b>Ekstrak</b><br><br><b>Buah Pare</b> | Buah Pare ( <i>Momordica charantia</i> ) termasuk tumbuhan famili <i>Cucurbitaceae</i> . Buah pare dimanfaatkan untuk tanaman pengobatan antidiabetes , antipiretik, antigout atau peradangan sendi disebabkan kadar asam urat tinggi (Bahagia , 2018) . Kandungan kompleks dalam buah pare diantaranya insulinmimetik ( karantin, polipeptida-p) , mineral, dan antioksidan ( saponin , fenol , flavanoid , isoflavon , terpenes , antrakuinon , dan glukosinolat ) , vitamin ( C, E, B1, B2, B3 B9 (folat)) , kalium , kalsium , magnesium , fosfor , zinc , dan besi. Proses ekstrak | Timbangan digital | Nominal |
|---|--|---|-------------------|---------|

|          |   |  |                   |         |
|----------|---|--|-------------------|---------|
|          |   | <p>buah pare diawali menyiapkan buah pare segar 50gr kemudian diberi 70% etanol sebagai pelarut dan ditempatkan di tempat tertutup yang disimpan sehari lalu di campurkan dan disaring . Ampas yang telah terkumpul dimaserasi dengan 70% etanol , di proses sampai mendapatkan maserat jernih dan higienis . Proses selanjutnya yaitu proses penguapan dengan temperatur vakum sekitar 40 derajat celcius kemudian membutuhkan freeze dryer</p> |                   |         |
| <b>4</b> | <p><b>Dosis</b><br/><b>Ekstrak</b><br/><b>Buah Pare</b></p> | <p>Perlakuan pemberian terapi ekstrak buah pare dengan dosis seperti berikut:<br/>K- : Kontrol negatif (tanpa diinduksi glukosa)</p>   | Timbangan digital | Nominal |

|  |  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
|  |  | <p>K<sup>+</sup> : Kontrol positif<br/>(diinduksi glukosa dosis 33 mM) pada hari ke 3</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Dosis 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.</li><li>• Dosis 2 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,2 mg/ml</li><li>• Dosis 3 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi</li></ul> |  |  |
|--|--|---|--|--|

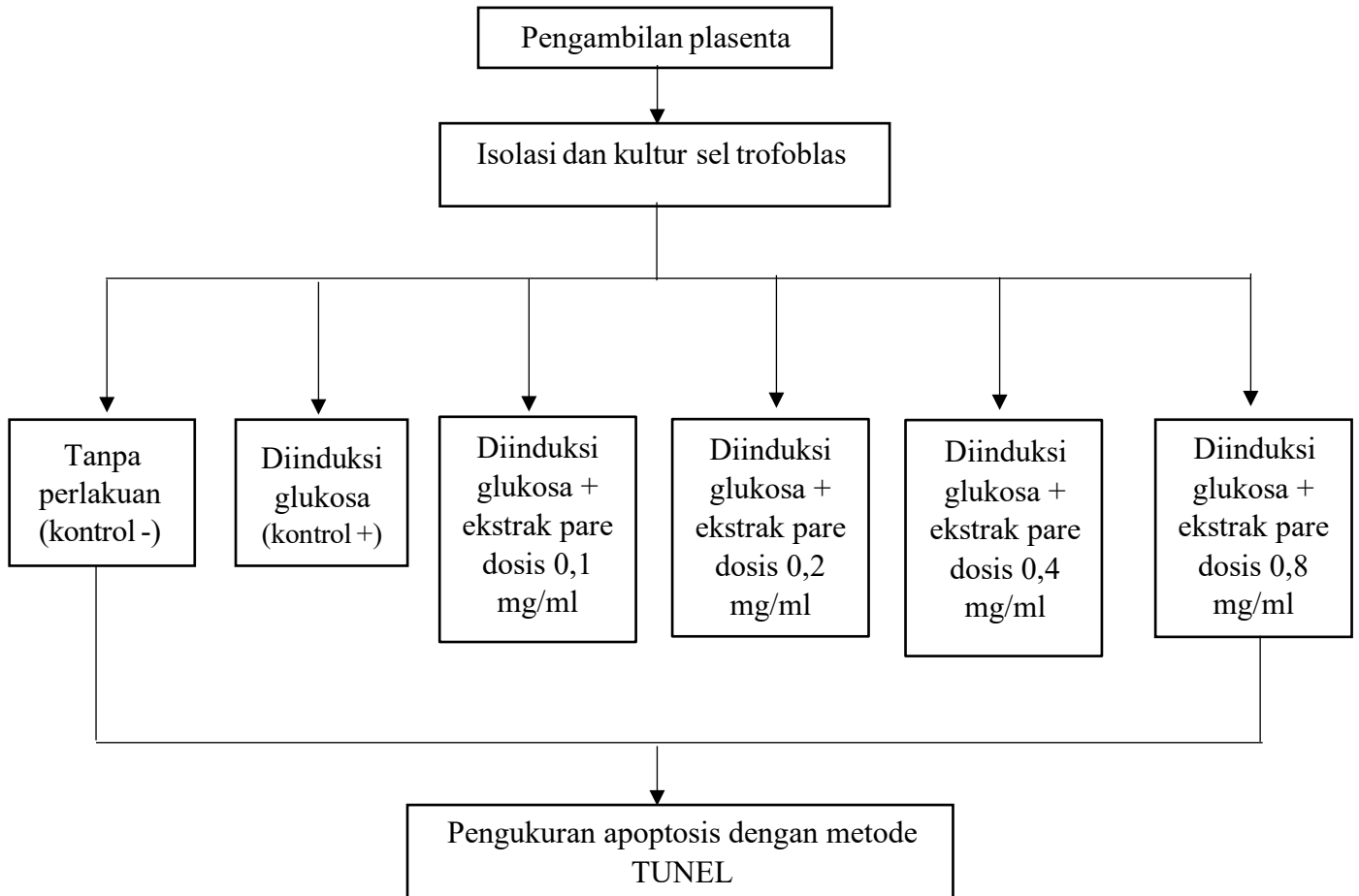
|   |                        |  |   |       |
|---|------------------------|--|---|-------|
|   |                        | <p>ekstrak buah pare<br/>dosis 0,4 mg/ml</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosis 4 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,8 mg/ml</li> </ul> <p>Selanjutnya setiap perlakuan dikultur dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 3 hari dan setiap kelompok diulang sebanyak 5 kali.</p> |   |       |
| 5 | <b>Kadar Apoptosis</b> | <p>Kadar apoptosis penelitian ini dengan fragmentasi DNA diperiksa dengan metode TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated UTP Nick End Labeling</i>). Reagen TUNEL . Dengan menggunakan mikroskop</p>  | <p>Medium M-199 dengan metode TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>).</p> | Rasio |



|  |  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
|  |  | <p>fluoresensi untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non-apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan. Digunakan metode <i>double staining</i> menggunakan reagen TUNEL yang dicounter stain dengan metylen Green . TUNEL akan mendeteksi sel apoptosis dan memberikan warna coklat , sedangkan metylen green akan mendeteksi sel non apoptosis dan memberikan warna hijau (Gondo, 2016).</p> |  |  |
|--|--|---|--|--|

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Alur Penelitian



Gambar IV.1 Kerangka Teori Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pare Terhadap Apoptosis Pada Sel Trofoblas Dalam Suasana Hiperqlikemia

## 2. Langkah – langkah penelitian

### a. Isolasi dan Kultur Sel Trofoblas

Prosedur penelitian melibatkan langkah-langkah sebagai berikut :

- Menyiapkan segera botol berisi larutan cord solution dari refrigerator (suhu 4°C) setelah kelahiran,
- Memotong plasenta dan langsung dimasukkan ke dalam larutan cord solution.
- Melakukan metode isolasi dan kultur sel trofoblas dilakukan berdasarkan modifikasi dari metode isolasi secara enzimatik.
- Mengambil sampel plasenta sel trofoblas agar tetap hidup untuk dibawa ke laboratorium, dibutuhkan media transport , yaitu : Dispase diproduksi oleh Roche, DNase , *Phosphate Buffred Saline* (PBS). Pada penelitian ini media transport menggunakan PBS (Zivkovic, 2011).
- Melapisi cover glass pada bagian dasar plate kultur 6 kelompok ditetesi dengan  $\pm 0,5- 1$  ml gelatin (0.2%) dan diinkubasi selama  $\pm 30-60$  menit.
- Mencuci jaringan plasenta menggunakan PBS-A steril (PBS-A) pH 7,4 yang mengandung antibiotik pen-strep dalam cawan petri sampai terbebas dari darah.
- Memotong jaringan sampai kecil  $\pm 2$  mm<sup>3</sup> dan dibilas dengan PBSA steril pH 7,4 yang mengandung pen-strep,
- Mempipet dan melakukan sentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Membuang supernatan dan pelet I diresuspensi dengan 5 mL medium kultur serum free (M-199 + penstrep),

- Mempipet dan melakukan sentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet II diresuspensi dengan medium kultur yang mengandung serum (M-199 + pen-strep + 10% FBS),
- Mengambil potongan jaringan sebanyak  $\pm 500\mu\text{L}$  dan dimasukkan pada plate kultur 6 kelompok yang diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 30 menit.
- Menambahkan 1,5 ml medium M-199 yang mengandung FBS 10% lalu diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C.
- Mengganti medium kultur dilakukan setelah 24 jam dengan M-199 + 10% FBS kemudian ditumbuhkan kembali pada incubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37 °C selama 3 hari kemudian dipanen.
- Mengambil sel trofoblas dari plasenta, bagian ini penting karena plasenta terdiri dari banyak sel. Untuk mendapatkan sel trofoblas dari plasenta, maka plasenta manusia diambil semua. Bagian plasenta yang diambil adalah bagian basal plasenta, dimana permukaan pertemuan plasenta dengan dinding rahim (*maternal fetal interface surface*).
- Memisahkan jaringan plasenta dari pembuluh darah, jaringan fibrous dan selaput ketuban dengan cara tumpul, dimana dapat digunakan bagian tumpul dari skapel.
- Mengisolasi trofoblas dari jaringan plasenta. Dimana 1 gram plasenta aterm yang diisolasi dan di biakan akan diperoleh sekitar 2,5 juta sel trofoblas.

- Menyuci jaringan fibrous dan pembuluh darah dibuang, jaringan plasenta kemudian jaringan dicacah. Suspensi jaringan diinkubasi dengan 0,2 % mg/ml Collagenase tipe I (Sigma) selama 45 menit, 37°C dengan *shaking*.
- Menghentikan inkubasi dengan menambahkan media kultur (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) DMEM/F12 (1:1) yang ditambahkan dengan 15 mmol/l *Hydroxypiperazineethansuphonic acid*, HEPES, 14 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 33 µmol/l biotin, 17 µmol/l D-pantothenate dan 10 % FBS).
- Memutar suspensi sel 1500 rpm selama 7 menit kemudian supernatan dibuang. Pelet yang mengandung sel trofoblas diresuspensi dengan media kultur kemudian sel diputar 1500 rpm selama 7 menit. Pelet diresuspensi lagi dengan media kultur ( Gondo , 2022 ) .

#### **b. Pemberian glukosa dan dosis ekstrak buah pare**

Pemberian glukosa sebagai model eksperimental kejadian DMG. 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 setelah kultur primer sel trofoblas yang telah konfluen setelah 3 hari berturut-turut.

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

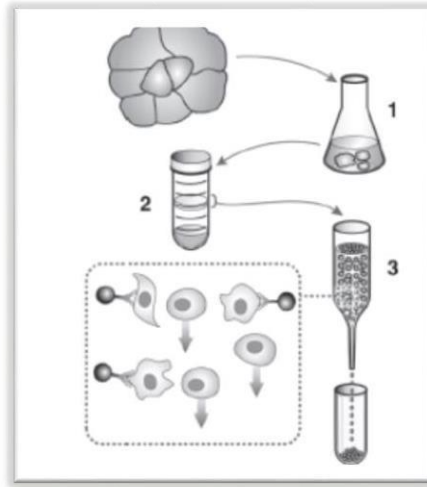
Dosis 3 : Diinduksi glukosa dosis 33 mM dan diberi ekstrak buah pare dosis 0,4 mg/ml

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

Selanjutnya setiap perlakuan dikultur dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 3 hari dan setiap kelompok diulang sebanyak 5 kali.

### **c. Pengukuran data**

Fragmentasi DNA merupakan salah satu ciri – ciri dari apoptosis. Dalam penelitian ini fragmentasi DNA diperiksa dengan metode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*). Reagen TUNEL terdiri dari enzim terminal transferase yang digunakan untuk mengenali ujung - ujung 3'OH (*nick end*) yang dihasilkan oleh fragmentasi DNA dan fluorescein-dUTP untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang akan diamati menggunakan mikroskop fluoresensi. Untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non-apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan, digunakan metode *double staining* menggunakan reagen TUNEL yang dicounter stain dengan metylen Green. TUNEL akan mendeteksi sel apoptosis dan memberikan warna coklat, sedangkan metylen green akan mendeteksi sel non apoptosis dan memberikan warna hijau ( Gondo, 2022 ).



Gambar IV.2 Langkah Isolasi dan Pemiakan Sel Trofoblas

Gambar 1 :

Langkah langkah isolasi dan pembiakan sel trofoblas manusia. Dibagi menjadi 3 langkah:

- Membersihkan plasenta 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 trofoblas.
- Preparat yang sudah disentrifuse, diambil larutan supernatant atau pelet nya.
- Sel sel trofoblas diperoleh dengan pipet pasteur diberikan cairan percoll untuk menentukan jumlah sel trofoblas.

*Sumber, Petroff MG., Philips TA., Pace Jl., et al. Isolation and Culture of Term Human Trophoblast Cells. In Placenta and Trophoblast Methods and Protocols Volume 1. Ed Michael J. Humana Press, New Jersey*

Setelah diperoleh isolasi yang masih belum benar – benar hanya terdiri sel trofoblas, maka untuk mengeliminasi dari jaringan lainnya dilakukan inkubasi preparat dengan menambahkan 20  $\mu$  anti-fibroblas dynabeads selama 10 menit. Maka setelah itu kemudian di peroleh preparat yang hanya mengandung sel-sel trofoblas. Setelah itu maka dilakukan pembiakan sel trofoblas.

### 3. 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:

- Peneliti : Aulia Fitriansi Desinta Ansori, Mahasiswa Fakultas Kedokteran Wijaya Kusuma Surabaya
- Asisten peneliti : Staff Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

### 4. Pengumpulan data

#### a. Prosedur pengumpulan data

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



### b. Jadwal dan Waktu Pengumpulan Data

Tabel IV.3 Jadwal dan Waktu Pengumpulan Data

| NO | KEGIATAN             | HARI |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |
|----|----------------------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
|    |                      | 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 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |

### 5. Bahan, alat, dan instrumen yang digunakan

#### A. ALAT

- Inkubator (kultur)
- TUNEL

#### B. Bahan

- Gelatin
- Larutan sampel
- Larutan standar
- Larutan stop solution
- Larutan *streptavidin-hrp*
- Pbs-a (*phosphate buffer saline a*)
- Plasenta

- Reagen
- Wash buffer

### **G. Metode Analisis Data**

Metode analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji One Way Anova . Uji yang digunakan untuk membedakan antara satu kelompok perlakuan dengan kelompok perlakuan yang lain, ada perbedaan yang signifikan jika nilai  $p < \alpha$  (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 concent ) dari ibu atau sampel setelah melewati persalinan *sectio caessarria* dengan memberikan penjelasan dan maksud tujuan dari penggunaan plasenta sebagai sampel penelitian.