

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* yang membandingkan aktivitas angiogenesis pada plasenta preeklampsia tanpa perlakuan dan dengan perlakuan (pemberian kurkumin dosis 0,01 mM dan vitamin E dosis 20 mg/L) secara semi kuantitatif. Dosis kurkumin yang digunakan berdasarkan pada dosis kurkumin yang telah dibuktikan mempunyai efek peningkatan sekresi VEGF oleh Gururaj dan kawan-kawan,¹³ dan dosis vitamin E yang digunakan juga berdasarkan pada dosis vitamin E yang telah dibuktikan mempunyai efek peningkatan aktivitas angiogenesis oleh Subakir dan kawan-kawan.³⁹ Aktivitas angiogenesis ditentukan dengan cara menilai skor migrasi sel-sel endotel pada eksplan plasenta yang ditanam pada medium kultur matriks kolagen 3 dimensi yang berisi sel-sel endotel.

III.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Pengambilan sampel dilakukan di Rumah Sakit Bersalin Budi Kemuliaan, Jakarta. Waktu penelitian antara bulan Juni 2005 sampai November 2005.

III.1.2 Populasi dan subyek penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah wanita hamil yang melahirkan di RS Bersalin Budi Kemuliaan Jakarta. Subyek dipilih secara *convenient sampling* antara bulan Juli sampai November 2005. Subyek penelitian merupakan kelompok ibu hamil dengan preeklampsia. Penelitian ini telah disetujui oleh Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan subyek penelitian mendapat *informed consent*.

III.1.3 Kriteria Pemilihan Subyek

- a. Ibu hamil berusia 20-40 tahun
- b. Masuk dalam kriteria preeklampsia:
 - Tekanan darah $\geq 140/90$ mmHg
 - Proteinuria $\geq 0,3$ g/24 jam atau $> 1+$ dengan pemeriksaan celup
 - Usia kehamilan ≥ 20 minggu

III.2 Besar Sampel

Perhitungan besar sampel minimal tiap-tiap kelompok berdasarkan pada rumus berikut:

$$n_1 = n_2 = n_3 = \left[\frac{z_{\alpha/2} + z_{\beta} \sqrt{PQ}}{P - 1/2} \right]^2$$

$n_1 = n_2 = n_3$ = Jumlah sampel tiap kelompok
 P = Proporsi kelompok kontrol
 Q = 1-P

Bila α 5% dan β 80%, maka sampel minimal yang diperlukan untuk tiap-tiap kelompok adalah 7,8 dan dalam penelitian ini akan digunakan 11 sampel.

III.3 Alat dan Bahan Percobaan

Alat Percobaan

- *Laminar flow*, Gelman Sciences Australia model No DFM 44 seri No 7231/86
- Inkubator, Forma Scientific
- pH meter
- Pengaduk magnetik, Thermix Stirrer Model 220T
- Alat sentrifus, Centrifuge Kokusan OSK FT-1275
- Neraca analitik, Sartorius GMBH Gottingen Type 1412 MP 8-1
- Mikroskop *Inverted phase contrast*, model clcc-TR-11, untuk memeriksa aktivitas angiogenesis dan pertumbuhan sel-sel endotel
- Cawan kultur bersumur 4 steril (*4-well plate*), Nunc Corporation
- Tabung sentrifus steril
- *Tissue Culture flask (TC flask)* yang dilapisi gelatin, Nunc Corporation, Roskilde, Denmark
- Pipet pasteur steril.
- *Scalpel*.
- Pinset anatomis.
- Pinset angiogenesis.
- Filter *disposable* dengan pori 0,2 μm .
- Cawan petri steril.
- *Syringe* steril ukuran 1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml.
- Lemari pendingin.
- Hemasitometer, *Improved Neubauer*. Untuk menghitung jumlah sel-sel endotel.

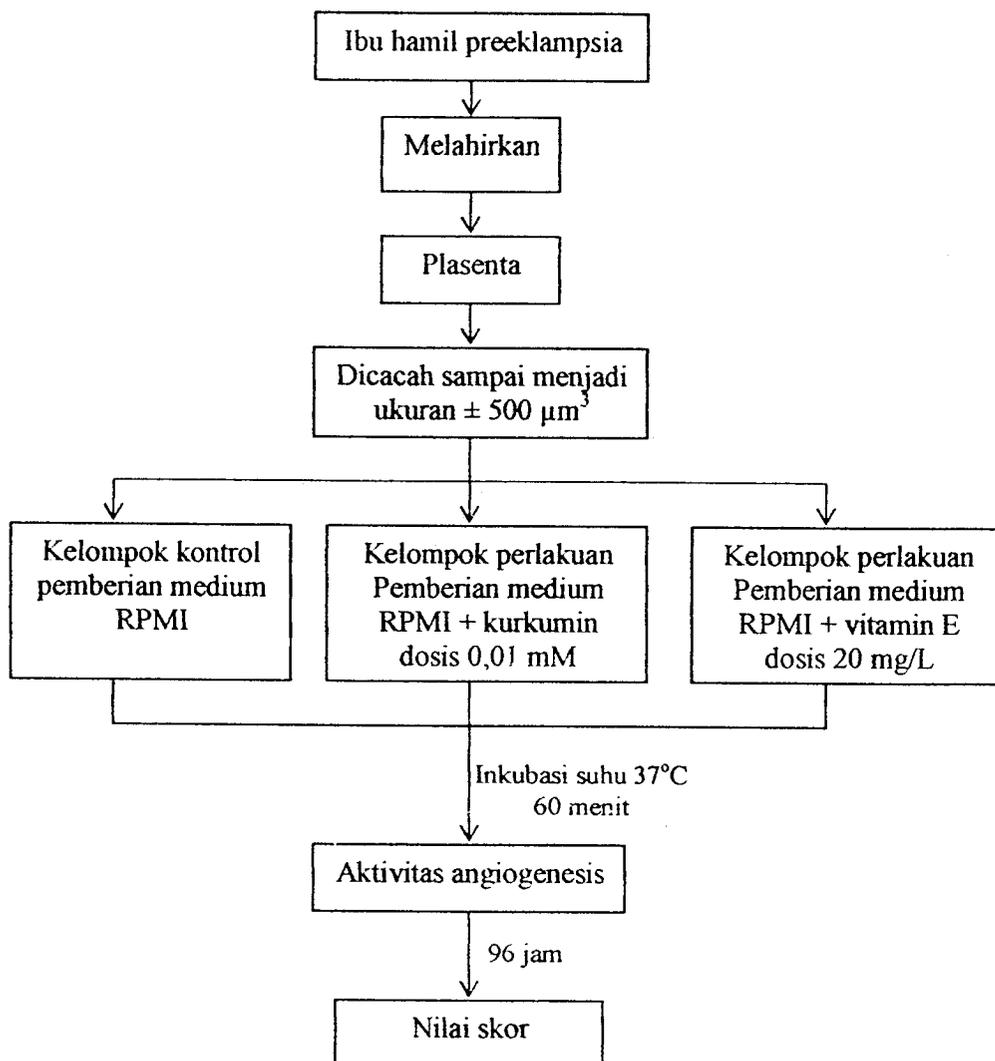
- Rak tabung dan rak pipet.
- Botol steril 50 ml, 100 ml.
- Tabung endorff steril.

Bahan Percobaan

- Jaringan plasenta kehamilan preeklampsia.
- *Green Africa Monkey Kidney Endothelial Cell Line*.
- Aquades steril.
- (\pm)- α -Tokoferol dari Sigma
- Serbuk kurkumin 80% dari Merck
- Medium RPMI 1640 (Flow Laboratories, Maclean, USA) untuk medium *continuous cell line* dan medium transpor.
- Medium NCTC 139 *liquid* (Sigma), untuk medium kultur angiogenesis.
- *Collagen* dari Sigma, sebagai gel kolagen untuk membentuk medium 3 dimensi.
- *Fetal bovine serum* (FBS) dari Sigma, sebagai suplemen medium *continuous cell line* dan medium kultur angiogenesis serta menghentikan kerja *trypsine*.
- Albumin 1%, menghentikan kerja tripsin
- Larutan NaOH 0,1 M, untuk mengatur pH.
- Larutan HCl 0,1 M, untuk mengatur pH.
- *Phosphate buffer saline* (PBS), untuk mencuci jaringan plasenta.
- Streptomisin (Schering-plough), sebagai antibiotika.
- Gentamisin (Schering-plough), sebagai antibiotika.
- Fungizone ((Flow Laboratories), untuk menghambat pertumbuhan jamur.

- *Trypsine* 0,05 %-EDTA 0.02 %, untuk melepaskan sel-sel endotel dari *TC flask* dan memisahkan antar sel-sel endotel.
- *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) untuk medium penyimpanan *endothelial cell line* pada suhu minus 80⁰ C.

III.4 Alur Penelitian



III.5 Pembuatan Medium

Medium RPMI 1640 stok merupakan medium transpor dan bahan dasar untuk pembuatan medium yang akan digunakan untuk mengkultur *endothelial cell line*. Medium RPMI 1640 stok dibuat dengan cara melarutkan bubuk RPMI 1640 dalam aquabides steril ditambah NaHCO_3 . Kemudian pH diatur hingga mencapai 7,4 dengan menambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 M atau HCl 0,1 M. Selanjutnya larutan disaring dengan filter berpori $0,2 \mu\text{m}$.

Lima puluh mililiter medium RPMI 1640 yang akan digunakan untuk mengkultur *endothelial cell line* dibuat dengan cara: 40ml RPMI 1640 stok ditambah FBS 10 ml. Sebelum digunakan FBS diinaktivasi dengan cara pemanasan 60°C selama 30 menit dan disaring dengan filter berpori $0,2 \mu\text{m}$. Untuk mencegah kontaminasi ditambahkan Fungizone 0,4 ml (untuk menghambat pertumbuhan jamur), Gentamisin 0,4 ml (sebagai antibiotika) dan streptomisin 0,4 ml (sebagai antibiotika), kemudian disaring dengan filter berpori $0,2 \mu\text{m}$.^{12,40}

Medium NCTC 139 merupakan medium yang digunakan untuk pemeriksaan aktivitas angiogenesis. Lima puluh mililiter medium NCTC 139 ini dibuat dengan cara: 40 ml Medium NCTC 139 *liquid* ditambah FBS 10 ml, Fungizone 0,4 ml, Gentamisin 0,4 ml dan streptomisin 0,4 ml, kemudian disaring dengan filter berpori $0,2 \mu\text{m}$.^{12,40}

III.6 Persiapan *Endothelial Continous Cell Line*

Green Africa Monkey Kidney Endothelial Cell Line (vero) yang diperoleh dari Namru Jakarta digunakan untuk pemeriksaan aktivitas angiogenesis. *Endothelial cell line* ini disimpan dalam tabung ependorf dengan medium RPMI 1640 yang telah diberi DMSO 10 % pada suhu minus 80°C . Beberapa hari sebelum digunakan,

endothelial cell line dikultur ulang. *Endothelial cell line* dikeluarkan dari penyimpanan minus 80⁰ C, dibiarkan pada suhu ruangan sampai mencair, kemudian disentrifus 2000 rpm selama 3 menit, supernatan dibuang, pelet yang berisi *endothelial cell line* disuspensikan kembali dengan medium RPMI 1640, lalu dimasukkan dalam TC flask dan ditambah medium sampai mencapai volume \pm 5-6 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C, 5% CO₂, setelah *confluent* (sel endotel tumbuh satu lapis dan menutupi seluruh permukaan *TC flask*)¹¹ sel dipanen dengan cara dicuci dengan PBS atau RPMI 1640 stok, kemudian diberi larutan tripsin 0,05 %-EDTA 0,02 % 2 ml dan diinkubasi selama 3 menit, untuk memberi kesempatan sel-sel endotel lepas dari dinding *TC flask* dan perlekatan antar sel-sel endotel juga lepas. Untuk menghentikan kerja tripsin ditambah albumin atau FBS, kemudian disentrifus (2000 rpm) selama 3 menit, supernatan dibuang, sel-sel endotel disuspensikan kembali dengan media kultur. *Endothelial cell line* ini kemudian ditambahkan dalam media kultur angiogenesis.^{12,40}

III.7 Isolasi dan Persiapan Jaringan Plasenta

Segera setelah lahir jaringan plasenta diambil secara steril sebesar ujung ibu jari tangan (sekitar 2x2 cm). Kemudian dimasukan dalam medium transpor RPMI 1640 stok pada temperatur 4⁰C dan segera dibawa ke laboratorium. Plasenta dimasukan dalam cawan petri, dicuci dengan betadin lalu dibilas dengan PBS. Setelah bersih pisahkan dari jaringan nekrotik dan darah, pilih jaringan yang berwarna merah jambu sebesar 0,5 cm dan dicacah dengan skalpel sampai sebesar ujung jarum (seukuran 500 μm^3), lalu jaringan plasenta yang telah dicacah tersebut dipisahkan ke dalam tiga cawan petri. Cawan petri I hanya berisi eksplan plasenta + larutan RPMI 1640 sebagai kontrol, cawan petri II berisi eksplan plasenta yang ditambahkan larutan

RPMI 1640 + kurkumin 0,01 mM dan cawan petri III berisi eksplan plasenta yang ditambahkan larutan RPMI 1640 + vitamin E 20 mg/L sebagai kelompok perlakuan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.^{12,40}

III.8 Pemeriksaan Aktivitas Angiogenesis

Aktivitas angiogenesis dinilai berdasarkan respons migrasi sel-sel endotel menuju eksplan plasenta yang dikultur dalam medium matriks kolagen 3 dimensi berisi sel-sel endotel sesuai metode Folkman dan Rogers seperti yang dilakukan Subakir.¹² Migrasi dan proliferasi sel-sel endotel merupakan bagian tahapan proses angiogenesis.

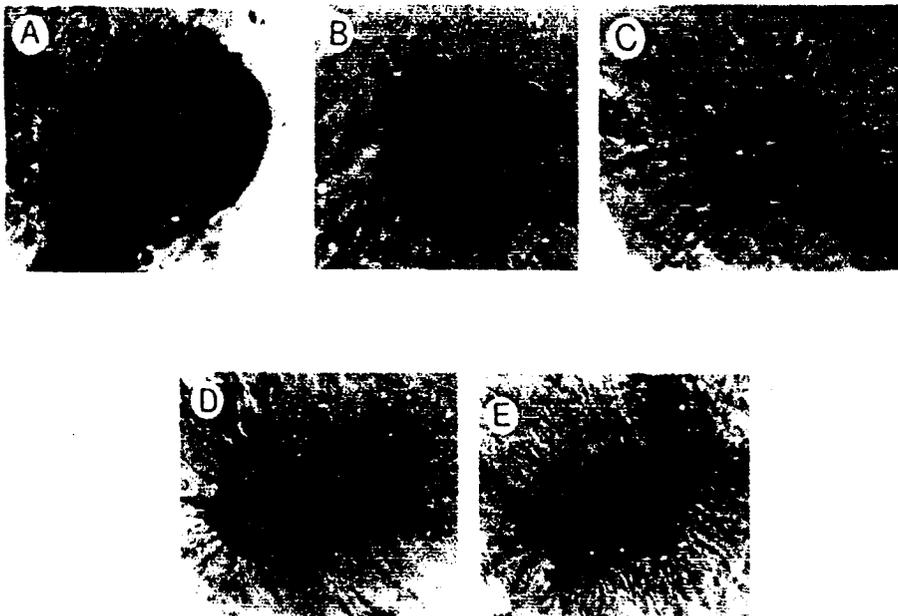
Penelitian ini menggunakan *endothelial cell line* (vero), kurang lebih 80.000-100.000 sel endotel disuspensikan dalam 2,5 ml medium NCTC 139. Medium diatur hingga pH-nya 7,4 dengan menambahkan 140 µl NaOH 1 M. Kemudian ditambahkan 2,5 ml *chilled vitrogen* 100 (matriks kolagen). Disiapkan dua cawan kultur yang masing-masing terdiri dari 4 sumur, tujuh dari delapan sumur yang ada masing-masing diisi dengan 0,7 ml campuran diatas, sehingga tiap sumur mengandung 12.000-14.000 sel endotel, satu sumur (sumur VIII) dibiarkan kosong. Selanjutnya tiga sampai empat eksplan plasenta yang berasal dari cawan petri I masing-masing dimasukkan ke dalam sumur I dan II dari cawan kultur. Eksplan plasenta dari cawan petri II masing-masing dimasukkan ke dalam sumur III dan IV. Eksplan plasenta dari cawan petri III masing-masing dimasukkan ke dalam sumur V dan VI. Sumur cawan kultur VII dibiarkan kosong, hanya berisi *endothelial cell line*. Kultur dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C, 5 % CO₂, 95 % air selama 96 jam.

Aktivitas angiogenesisnya diobservasi menggunakan mikroskop *inverted phase kontras* tiap 24 jam, kemudian dievaluasi skor migrasi sel-sel endotel menuju

jaringan yang ditanam secara semi-kuantitatif dengan pemberian skor dari 0 sampai 4 (gambar 7).

- 0 : tidak ada migrasi
- 1 : elongasi dan beberapa orientasi ke arah eksplan
- 2 : pembentukan *spokewheel* minimal
- 3 : pembentukan *spokewheel* sedang
- 4 : pembentukan *spokewheel* ekstrim.

Juga dilakukan dokumentasi untuk menjamin konsistensi penetapan skor.¹²



Gambar 7. Penilaian migrasi sel sel endotel¹²

III.9 Parameter yang diteliti

Parameter yang dianalisis adalah aktivitas angiogenesis dengan menilai respons migrasi sel-sel endotel, dilakukan dengan menggunakan metode Folkman dan Rogers.³⁵ Pada penelitian ini penilaian skor migrasi sel-sel endotel menuju eksplan plasenta yang ditanam pada medium matriks kolagen 3 dimensi dilakukan pada inkubasi hari ke 4 (96 jam), skor aktivitas angiogenesis tiap sampel plasenta ditentukan berdasarkan respons median dari eksplan plasenta yang ditanam. Selain itu juga dihitung respons rerata (mean) untuk masing-masing kelompok plasenta.

III.10 Analisis data

Data yang diperlukan dikumpulkan melalui formulir yang telah disediakan dan dikumpulkan dalam satu tabel induk, kemudian diolah dengan komputer menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) 11.5. Oleh karena data yang didapat berupa data ordinal, membandingkan dua kelompok (kelompok kontrol dengan kelompok pemberian kurkumin, dan kelompok kontrol dengan kelompok pemberian vitamin E) dan berhubungan/*dependent*, maka uji analisis data yang akan digunakan adalah uji non parametrik Wilcoxon dengan batas kemaknaan $p < 0,05$.