

BAB 3
METODE PENELITIAN

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian berlangsung selama satu bulan dimulai pada tanggal 30 November 2005 sampai 30 Desember 2005. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) dengan strain BALB/c berumur dua bulan yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Wonocolo, Surabaya. Mencit-mencit tersebut dikelompokkan sebagai berikut, sebanyak 21 ekor mencit betina untuk dibuntingkan, 21 ekor mencit normal untuk uji biologis dan 12 ekor mencit lainnya untuk perbanyak isolat.

Mencit dipelihara selama kurang lebih satu minggu sebelum dilakukan perlakuan di dalam bak plastik yang dilengkapi dengan sekam dan tempat minum. Selama pemeliharaan mencit diberi pakan ayam berupa pellet dan minum secara *ad libitum*.

3.2.2. Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain isolat takizoit *T. gondii* strain RH yang diperoleh dari BALITVET Bogor, larutan NaCl fisiologis, preparat hormon steroid (PMSG 5 IU dan HCG 5 IU), alkohol 70%, oil emersi,

pewarna asam pikrat, aquadest dan pakan ayam Bangkok no. 594 produksi UD. Sopyono.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian meliputi kandang mencit, sekam, tempat minum, *gloves*, scalpel, pinset, jarum pentul, papan seksi dari gabus, *sprit* 1 ml dan 5 ml, mikropipet, tabung Appendorf 1,5 ml, *object glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya, *counting chamber* (mikro-hemositometer), tissue, kertas label, dan kamera digital.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode laboratorium eksperimental. Ada beberapa tahap penelitian yang dilakukan yaitu: kultivasi *T. gondii*, penyerentakan birahi dan pembuntingan mencit, infeksi mencit bunting, uji biologis dan deteksi *T. gondii* di dalam cairan peritoneum mencit.

3.3.1. Kultivasi *In Vivo* / Perbanyak Isolat

Kultivasi dilakukan pada mencit BALB/c umur dua bulan dengan menginokulasikan sebanyak 0,3 ml takizoit dalam larutan NaCl fisiologis ke tubuh mencit secara intraperitoneal. Setelah mencit menunjukkan gejala parasitemia yang ditandai dengan tubuh lemah, lesu, nafas tersengal-sengal, abdomen terlihat ascites, bulu berdiri dan kusam, maka mencit segera dikurbankan untuk diambil cairan peritoneal.

Mencit dibunuh dengan cara didislokasio antara *os frontal* dan *os atlas*, kemudian abdomennya dibedah dengan insisi terlebih dahulu pada kulit, lalu kulit

dikuakkan ke arah cranial. Kemudian ke dalam rongga peritoneum mencit dimasukkan 2-3 ml larutan NaCl fisiologis, dipasase dan cairan diambil kembali dengan spuit. Cairan peritoneal tersebut diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X untuk memastikan adanya takizoit dalam cairan peritoneum dan menunjukkan bahwa gejala yang timbul pada mencit benar-benar akibat infeksi *T. gondii*. Cairan peritoneal yang menunjukkan positif adanya takizoit pada pemeriksaan mikroskop, selanjutnya diencerkan dengan NaCl fisiologis lalu diinjeksikan kembali ke mencit lain untuk dilakukan pemanenan (Suwanti, 1996). Sebelum takizoit diinokulasikan pada mencit perlakuan, terlebih dahulu dilakukan penghitungan jumlah takizoit menggunakan hemositometer hingga didapatkan dosis infeksi 20 takizoit dalam 0,3 ml NaCl fisiologis (Mufasirin dkk., 2005).

3.3.2. Sinkronisasi Birahi dan Pembuntingan Mencit

Untuk mendapatkan hewan coba dengan umur kebuntingan yang sama, 21 ekor mencit betina digertak birahi dengan kombinasi 5 IU PMSG yang dilanjutkan dengan injeksi 5 IU HCG 48 jam berikutnya secara subkutan. Setelah penyuntikan, mencit betina dikawinkan dengan cara diletakkan dalam satu kandang dengan pejantan menggunakan sistem kawin monogami (satu jantan untuk satu betina). Biasanya mencit kawin pada malam hari.

Keesokan harinya dari vagina mencit betina diamati adanya *vaginal plug*. *Vaginal plug* adalah bentukan cairan kental yang dikeluarkan oleh kelenjar aksesoris mencit jantan yang tidak tahan lama, berwarna putih sampai kekuning-

kuningan, yang menyumbat vagina dari servik sampai vulva mencit betina. Adanya *vaginal plug* mengindikasikan telah terjadi kopulasi antara mencit betina dengan mencit jantan pada malam harinya. Ditemukannya *vaginal plug* pada vagina mencit betina waktu pagi harinya, dikatakan mencit betina tersebut telah bunting 0,5 hari (Mouse Breeding Techniques, 2004 dalam Suwanti, 2005). Masa kebuntingan mencit ialah 19-20 hari (Kusumawati, 2004).

3.3.3. Infeksi Mencit Bunting

Penelitian ini menggunakan 21 ekor mencit betina umur dua bulan yang sudah dilakukan penyerentakan birahi dan pembuntingan mencit seperti tersebut di atas. Mencit betina yang telah bunting dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

Minggu I: kelompok perlakuan mencit bunting yang diinfeksi umur kebuntingan 4,5 hari (minggu pertama)

Minggu II: kelompok perlakuan mencit bunting yang diinfeksi umur kebuntingan 8,5 hari (minggu pertama)

Minggu III: kelompok perlakuan mencit bunting yang diinfeksi umur kebuntingan 14,5 hari (minggu pertama)

Periode kebuntingan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba adalah 19-20 hari, maka pembagian umur kebuntingan pada kelompok perlakuan disesuaikan dengan lama kebuntingan mencit dan menjadi minggu I, II dan III. Pada penelitian ini mencit bunting umur 4,5 hari mewakili kelompok kebuntingan trimester pertama, mencit bunting umur 8,5 hari mewakili kelompok kebuntingan

trimester kedua dan mencit bunting umur 14,5 hari mewakili kelompok kebuntingan trimester ketiga.

Masing-masing kelompok tersebut diinokulasi *T. gondii* dengan dosis infeksi 20 takizoit dalam 0,3 ml NaCl fisiologis secara intraperitoneal. Dosis infeksi tersebut, menurut penelitian yang dilakukan oleh Mufasirin dkk. (2005) dilatarbelakangi oleh penelitian yang dilakukan oleh Subekti dari BALITVET Bogor (tidak dipublikasikan), dengan menginokulasikan 100-1000 takizoit dapat membunuh mencit dalam waktu 8-9 hari. Penelitian ini menggunakan 20 takizoit, diharapkan mencit bertahan untuk waktu yang lama (Mufasirin dkk., 2005). Masing-masing kelompok ditempatkan dalam kandang yang terpisah dan dilakukan pengamatan secara rutin terhadap timbulnya gejala parasitemia. *Strain* RH takizoit *T. gondii* dapat mematikan mencit yang terinfeksi secara eksperimental kurang dari seminggu (Howe *et al.*, 1997 dalam Suwanti, 2005). Empat hari pasca inokulasi, masing-masing kelompok dikurbankan untuk diambil uterusnya guna pemeriksaan uji biologis.

3.3.4. Uji Biologis dan Deteksi Takizoit *T. gondii* pada Organ Uterus Induk

Uji biologis dilakukan untuk membuktikan keberadaan stadium takizoit (infeksi akut) pada uterus induk yang terinfeksi *T. gondii* pada periode kebuntingan yang berbeda. Uterus masing-masing mencit perlakuan diambil dan ditimbang beratnya. Untuk mendapatkan konsentrasi yang sama, uterus yang telah dihitung beratnya (dalam gram), dilakukan homogenisasi di dalam tabung eppendorf dengan pelarut NaCl fisiologis dengan perbandingan 1:15 (NaCl

ditambahkan sebanyak 15 kali berat uterus) (Mufasirin dkk., 2005). Setelah dilakukan homogenisasi dan terjadi pengendapan, supernatan diambil dengan spuit sejumlah 0,3 ml lalu diinjeksikan secara intraperitoneal ke 21 ekor mencit normal yang dibagi menjadi tiga perlakuan, yaitu:

P1: kelompok perlakuan uji biologis uterus mencit yang diinfeksi 4,5 hari

P2: kelompok perlakuan uji biologis uterus mencit yang diinfeksi 8,5 hari

P3: kelompok perlakuan uji biologis uterus mencit yang diinfeksi 14,5 hari

Remington *et al.* (1995) yang dikutip oleh Sardjono (2005) menyatakan bahwa kista terbentuk paling cepat satu minggu dari awal infeksi. Sasmita dkk. (2003) menambahkan bahwa takizoit yang diinokulasikan ke tubuh mencit secara intraperitoneal diperiksa seminggu kemudian terhadap keberadaan takizoit di dalam cairan peritoneal mencit. Bertolak dari pernyataan tersebut, maka pengamatan rutin terhadap gejala parasitemia dan kematian dilakukan hingga tujuh hari pasca inokulasi lalu mencit dikurbankan untuk diambil cairan peritoneal.

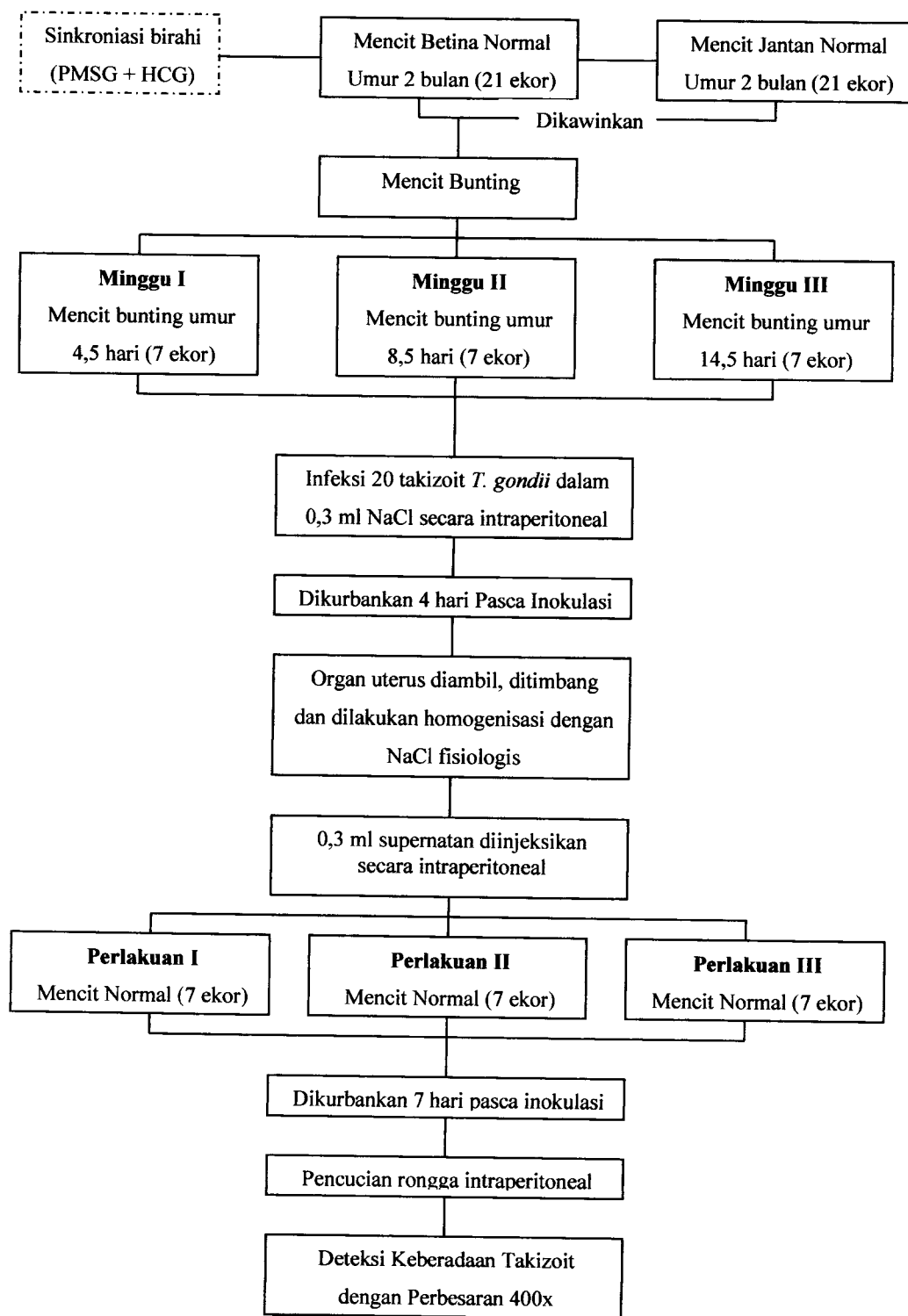
Standarisasi pembedahan mencit harus mengikuti aturan dan estetika yang ada, yaitu dengan cara didislokasio antara *os frontal* dan *os atlas*, kemudian mencit diletakkan di atas papan bedah dan abdomennya dibedah dengan insisi lebih dulu pada kulit lalu kulit dikuakkan ke arah cranial. Sebelum mengambil cairan peritoneum mencit, terlebih dahulu dimasukkan 2-3 ml larutan NaCl fisiologis ke dalam rongga peritoneum mencit, dipasase lalu cairan diambil kembali dengan spuit. Larutan tersebut diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X untuk memastikan adanya stadium akut takizoit dalam

cairan peritoneum dan menunjukkan bahwa gejala yang timbul pada mencit benar-benar akibat infeksi *T. gondii*. Apabila dalam penelitian tersebut, mencit yang dilakukan pemeriksaan uji biologis mengalami kematian sebelum tujuh hari pasca inokulasi atau sebelum dikurbankan, tetap dilakukan deteksi terhadap takizoit *T. gondii*.

Keberadaan takizoit *T. gondii* dalam cairan peritoneal mencit dideteksi di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Hasil pemeriksaan uji biologis organ uterus dikatakan positif apabila dalam cairan peritoneal mencit terlihat bentukan takizoit yang menyerupai pisang atau bulan sabit, demikian sebaliknya dikatakan negatif bila tidak tampak bentuk takizoit yang menyerupai pisang atau bulan sabit tersebut. Mencit yang menunjukkan positif pada pemeriksaan uji biologis, dapat disimpulkan bahwa takizoit *T. gondii* menginfeksi semua sel induk semang termasuk di dalamnya sel jaringan uterus induk bunting sehingga mengakibatkan terjadinya penularan transplasental yang berdampak buruk bagi fetus yang dikandungnya.

3.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan variable yang diamati yaitu pemeriksaan uji biologis pada organ uterus mencit yang berbeda periode kebuntingannya (minggu I, II dan III). Jika terdapat perbedaan keberadaan takizoit *T. gondii* pada uterus mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan minggu I, II, dan III, maka data tersebut dianalisis menggunakan uji *Chi-Square*.



Gambar 3.1. Kerangka Operasional Penelitian