

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group desain*, yaitu dalam rancangan ini perlakuan atau intervensi telah dilakukan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau post test (Notoatmodjo, 2010). Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus Norvegicus* strain wistar.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin laki-laki usia 8-12 minggu
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat
- d. Tidak mengalami pengobatan atau paparan sebelumnya

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit pada masa penelitian
- b. Tikus mati pada masa penelitian

4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subject penelitian, yaitu:

1. Kontrol negatif (K-) : diet normal, tanpa pemberian antibody IgY dan tanpa induksi *P. gingivalis* selama 2 minggu.
2. Kontrol positif (K+) : diet normal, tanpa pemberian antibody IgY namun diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu.
3. Perlakuan 1 (P1) : diet normal, pemberian antibody IgY konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu.
4. Perlakuan 2 (P2) : diet normal, pemberian antibody IgY konsentrasi 30 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu.
5. Perlakuan 3 (P3) : diet normal, pemberian antibody IgY konsentrasi 45 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu.

4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Menurut Solimun (2011), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut

$$p(n-1) \geq 15$$

Dengan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 6 kali. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $6 \times 5 = 30$ hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah antibodi imunoglobulin y (IgY) dengan berbagai konsentrasi.

4.3.2 Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah kadar MMP-8 tikus putih *Rattus Norvegicus* strain wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian dilakukan di beberapa tempat:

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat kultur dan pemeliharaan bakteri *P. gingivalis*.
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat ekstraksi antibodi IgY.
3. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat uji ELISA.
4. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan.

4.4.2 Waktu

Penelitian ini berlangsung selama 2 bulan, yaitu bulan Agustus sampai dengan bulan Oktober 2018.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat/Instrumen penelitian

1. Alat Pemeliharaan Hewan coba
 - a. Kandang dari bak plastik
 - b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
 - c. Botol air untuk minum
 - d. Timbangan
 - e. Tempat pakan
 - f. Form pemantauan sisa pakan tikus dan form pemantauan berat badan tikus
2. Alat Pembuatan Makanan Tikus
 - a. Baskom plastik
 - b. Timbangan
 - c. Pengaduk
 - d. Handscoon
 - e. Gelas ukur
 - f. Sonde
3. Alat ekstraksi antibodi IgY
 - a. Sendok
 - b. Gunting
 - c. Lancet
 - d. Tube 50 ml
 - e. Gelas ukur

- f. Mikropipet
 - g. Appendorf
 - h. Pengaduk
 - i. Vortexer
 - j. Rolling mixer
 - k. Sentrifugasi
- 4. Alat untuk injeksi ke tikus
 - a. Syringe 5 ml
 - b. Syringe 1 ml
 - 5. Alat pemeriksaan kadar MMP-8
 - a. ELISA Kit MMP-8 *Rat*
 - b. ELISA *Reader*
 - c. Inkubator

4.5.2 Bahan Penelitian

- 1. Diet Normal (PARS, tepung terigu, air)
- 2. Bakteri *P. Gingivalis*
- 3. PBS
- 4. Booster CFA dan IFA
- 5. Telur ayam
- 6. *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000
- 7. Reagen ELISA Kit

4.6 Definisi Operasional

- 1. Immunoglobulin Y (IgY) adalah antibody utama pada aves dan reptil yang memiliki peranan biologis yang sama dengan IgG pada mamalia, yaitu immunoglobulin utama yang memberikan pertahanan terhadap agen infeksi. IgY ditemukan di darah dan di cairan pecahan dari telur.

2. MMP adalah suatu enzim proteolitik yang mempengaruhi degradasi kolagen dari makromolekul matriks ekstraseluler. Matriks metalloproteinase, terutama MMP-8 dikenal dominan dan bentuk paling umum dari penyakit periodontal. MMP-8 terlarut pada serum darah. Pengukuran kadar MMP-8 menggunakan ELISA kit MMP-8 *Rat*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemberian Pakan Tikus

Kebutuhan pakan tikus perhari adalah 40 gram perhari. Seluruh tikus dalam seluruh kelompok mendapatkan diet makanan normal 40 gram per hari.

4.7.2 Pemilihan Tikus Galur Wistar

- a. 30 ekor tikus putih (*Rattus Novergicus strain wistar*) dipilih yang memenuhi syarat sampel, kemudian dibagi dalam 5 kelompok kontrol. Cara pemilihan tikus yaitu dengan memberi nomor urut pada tiap tikus, kemudian nomor undian ditulis pada kertas kecil lalu dilipat dan dimasukkan dalam kotak undian. Pemilihan secara acak agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.
- b. Pada akhir percobaan dilakukan pembedahan terhadap tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian dilakukan pengukuran kadar MMP-8.

4.7.3 Identifikasi Bakteri *P. gingivalis*

Identifikasi bakteri telah dilakukan di Universitas Airlangga Surabaya.

4.7.4 Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Cara membuat suspensi *P.gingivalis* adalah dengan mencampur 2 ml larutan BHI-B steril dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis* dan dihomogenkan diatas sentrifuge. Setelah dilakukan pengenceran dan penambahan aquades steril diukur absorbansinya dengan standar Mc

Farland 0,5 dengan absorbansi 0,05 dan panjang gelombang 560 nm menggunakan spektrofotometer (Ermawati T, 2013).

4.7.5 Pemilihan Ayam

Dalam penelitian ini digunakan 2 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* berusia 24 minggu betina yang siap bertelur. Ayam dipelihara secara terpisah dalam kandang berukuran (128 x 65 x 80 cm) untuk dua ekor ayam dan diberi pakan komersil ayam petelur dan air minum *ad libitum*. Dalam penggunaan ayam sebagai keperluan penelitian, tempat pemeliharaan ayam penting untuk lebih diperhatikan, lebih baik ayam dipelihara di dalam ruangan serta terdapat pembatasan peneliti yang dapat masuk (Schade, 2015).

4.7.6 Produksi Antibodi IgY *P. gingivalis*

Menggunakan 2 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* 24 minggu betina yang siap bertelur (Carlender, 2002), kemudian pada bawah sayap ayam yang sudah bertelur tersebut disuntikkan 30 µg antigen OMP *P. gingivalis* hasil elektroluensi melalui subkutan. Suntikan yang pertama dicampur dengan complete *Freud's adjuvan*. Suntikan kedua dan selanjutnya dicampur dengan incomplete *Freud's adjuvan* dengan selang waktu 1 minggu. Telur dipanen pada hari ke 5 sampai hari ke 17 setelah pemberian suntikan *booster* ke 2 (Susilo dkk, 2004).

Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur, kemudian diletakan diatas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur di lubangi dengan cara diangkat dengan pinset, cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4. Setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi 5,0 sampai 5,2 dan disimpan pada suhu 4 °C selama 20 menit

dan supernatan diambil sehingga diperoleh *Water Soluble Fractination* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7.5. Ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6000 dan amonium sulfat. PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi serta mengendapkan IgY (Poison et al *dalam* Pauly D, 2011). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan.

4.7.7 Uji Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Uji SDS-PAGE ini digunakan untuk dapat mengetahui keberadaan IgY berdasarkan berat molekulnya. Proses elektroforesis (SDS-PAGE) ekspresi IgY menggunakan metode standar oleh Laemmli (1970). Hasil dari uji SDS-PAGE dibandingkan dengan profil SDS-PAGE IgY sesuai literatur.

4.7.8 Uji Western Blot

Metode ini bertujuan untuk menguji apakah antibodi yang didapatkan dari telur ayam merupakan antibodi terhadap OMP dari *P. gingivalis*. Dalam uji ini direaksikan antara antigen yaitu OMP *P.gingivalis* dengan antibodi primer yaitu IgY. Prosedur uji ini adalah gel elektroforesis tanpa pewarnaan direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Membran nitroselulosa direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Filter tebal (2 buah) ditambah Kasa biasa (2 buah) direndam dalam transfer buffer selama 5 menit. Susun Sandwich terdiri dari filter tebal 2 buah, kertas saring 2 buah, *Nitrocellulose membrane*, gel, kertas saring 2 buah dan filter tebal 2 buah. Transfer pada 0,3 A, 20 Volt selama 2 jam. Cuci membrane nitroselulosa dengan aquadest untuk menghilangkan gel yang melekat. Rendam dengan Ponceau 2% selama 3 menit. Cuci dengan aquadest sampai warna hilang. Blocking dengan TBS pH 7,4 dan BSA 3% selama 2 jam menggunakan shaker pada suhu ruangan. Tambahkan antibodi primer perbandingan 1:100 *overnight* pada suhu 4°C. Inkubasikan pada suhu ruangan pada shaker selama 2 jam. Cuci dengan TBS 3 kali 5 menit. Tambahkan substrat

alkaline phosphatase selama 30 menit dan siap direkam. Hasil dari uji *Western Blot* dibandingkan dengan profil SDS-PAGE antara IgY dengan OMP *P. gingivalis* dari literatur.

4.7.9 Membuat Tikus Model Periodontitis

Injeksi *P.gingivalis* dengan konsentrasi 5µg/0,05mL sebanyak 0,2 mL pada gigi insisif rahang bawah dan diberikan secara intrasulkus sebanyak 3 hari sekali selama dua minggu. Pada hari ke-14, seluruh sampel dilakukan dekaputasi (Ernawati, 2013).

4.7.10 Aplikasi Antibodi IgY

Antibodi IgY diberikan kepada hewan coba secara injeksi intrasulkus sebanyak 1 ml pada gigi insisif rahang bawah tikus pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dengan dosis masing-masing sebesar 15 µg/ml, 30 µg/ml, dan 45 µg/ml. Pemberian antibodi IgY diberikan sebanyak satu kali.

4.7.11 Pengambilan Sampel

Enam ekor tikus wistar pada setiap kelompok I, II, III, IV dan V dilakukan dekaputasi setelah pemberian antibodi IgY dan 2 minggu pemaparan *P.gingivalis*. Dekaputasi dilakukan dengan cara menganastesi terlebih dahulu tikus dengan eter. Tikus dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang terdapat obat anastesi eter di dalamnya, lalu ditunggu hingga tikus kehilangan kesadaran. Selanjutnya dilakukan pembedahan jantung tikus, dan pengambilan sampel darah sebanyak 3 cc. Kemudian darah disentrifuge untuk diambil serumnya, kemudian serum disimpan dalam *freezer* -20°C, sampai jumlah sampel mencukupi.

4.7.12 Pengukuran Kadar MMP-8

Pengukuran kadar MMP-8 menggunakan ELISA kit MMP-8 *Rat*. Dimana prosedur awal dimulai dengan *coating* antigen serum darah pada *microplate* lalu dilanjutkan dengan *blocking buffer*, penambahan antibodi primer, penambahan antibodi sekunder, dan penambahan streptavidin-horseradish peroxidase (SAHRP) sebagai enzim. Setelah itu, dilakukan penambahan stop solution untuk menghentikan reaksi dengan HCl yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Tahap akhir adalah dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang ($\lambda=450$ nm).

4.8 Alur Prosedur Penelitian

Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian

4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengamatan kadar MMP-8 pada tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variences*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar MMP-8 antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *One Way Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$ dan hipotesis yang menyatakan bahwa antibodi IgY dapat menghambat peningkatan kadar MMP-8 yang diamati dari ekspresinya pada tikus *Rattus Novergicus* strain wistar terbukti. Namun apabila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak. H_0 pada penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan kadar MMP-8 pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, H_1 pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan kadar MMP-8 antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.