

**BAB 4****METODE PENELITIAN****4.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium *post test only control group design* untuk mengetahui peningkatan sel T CD4<sup>+</sup> pada mencit yang diinduksi *outer membrane M. Tuberculosis* dengan rute subkutan. Objek penelitian (mencit galur BALB/c) berjenis kelamin jantan dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, yaitu mencit yang diinduksi dengan *outer membrane M. tuberculosis* dan yang tidak diinduksi. Tiap kelompok perlakuan terdiri dari 9 ekor mencit.

**4.2 Sampel Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan hewan coba mencit galur BALB/c yang dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel yang dipakai adalah mencit jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan 25-30 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif.

**4.3 Estimasi Jumlah Besar Sampel**

Dasar jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus Federer, yaitu:

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

Keterangan : n: Jumlah pengulangan tiap perlakuan

P: Jumlah perlakuan

Penelitian ini menggunakan 2 perlakuan (p), yaitu 1 kontrol positif, dan 1 kelompok perlakuan (mendapat injeksi *outer membrane M. tuberculosis*) sehingga didapatkan jumlah pengulangan sampel

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

$$[(2n-1) - (2-1)] \geq 16$$

$$(2n-1) - 1 \geq 16$$

$$(2n-1) \geq 17$$

$$2n \geq 18$$

$$n \geq 9 \text{ ekor}$$

Jadi jumlah pengulangan tiap-tiap kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan 9. Sebagai cadangan, 1 ekor mencit ditambahkan pada setiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi kemungkinan yang tidak diinginkan seperti kematian, kegagalan pengambilan sampel dan lain-lain. Jadi untuk 2 kelompok perlakuan dibutuhkan sebanyak 20 ekor mencit.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Waktu penelitian pada bulan April-Juli 2013.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *outer membrane M. Tuberculosis* dengan berat molekul 71 kDa .

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah peningkatan prosentase sel T CD4+ pada limpa mencit.

#### 4.5.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini, yaitu: jenis mencit (mencit galur BALB/c), umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan awal, kondisi lingkungan kandang, dan pemberian injeksi *outer membrane M. tuberculosis* secara subkutan.

#### 4.6 Definisi Operasional

- *Outer membrane* yang digunakan adalah *outer membrane Mycobacterium tuberculosis* galur H37Rv milik Dr. dr. Dwi Yuni Hidayati, M. Kes, yang diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
- Mencit yang digunakan adalah dari galur BALB/c, jenis kelamin jantan, usia 6-8 minggu, dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif dan diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
- Pengukuran kadar sel T CD4+ dilakukan dengan alat *flowcytometry*. Kadar sel T CD4+ adalah prosentase sel T CD4+ terhadap semua sel yang ada pada hasil pengukuran.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Alat dan Bahan Untuk Pemeliharaan Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, pakan *comfeed* (makanan standar mencit).

#### **4.7.2 Alat dan Bahan Isolasi Outer Membrane**

Alat dan bahan yang diperlukan adalah sentrifus dingin, vortex, dan falcon. Bahan-bahan yang diperlukan adalah hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis*, asam trikloroasetat, dan PBS.

#### **4.7.3 Alat dan Bahan Elektroforesis SDS-PAGE**

Alat-alat yang diperlukan adalah alat elektroforesis, shaker, dan pipet mikro. Bahan-bahan yang diperlukan adalah Acrylamida 30%, Tris HCl 1,5, pH 8,8, Aquades steril, SDS 10 %, TBS, Temed, dan sampel.

#### **4.7.4 Alat dan Bahan Untuk Vaksinasi Subkutan**

Bahan-bahan yang diperlukan adalah *Outer membrane M. tuberculosis* dan PBS (*phosphate buffer saline*). Alat-alat yang diperlukan adalah Pipet mikro, Sput 1 cc, Ependorf, Vortex, Falcon, Alkohol 70%, Kapas steril, dan Handscoon.

#### **4.7.5 Alat dan Bahan Untuk Pembedahan dan Pengambilan Organ Mencit**

Alat-alat yang diperlukan adalah Gunting, Cawan petri, Toples, Spuit 1 cc, dan kapas. Bahan-bahan yang diperlukan adalah Ether dan PBS.

#### **4.7.6 Alat dan Bahan Untuk Persiapan Sampel *Flowcytometry***

Alat-alat yang digunakan adalah Alat gerus, Mikropipet, dan tip, Cawan petri, Falcon, Alat sentrifugasi, Tabung flowcytometry, dan Kertas Label. Bahan-

bahan yang diperlukan Fikol, PBS, PBS + FBS 2%, antibodi CD4<sup>+</sup> dan Limpa mencit.

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Prosedur Isolasi OMP

- a) Towing pelete + PBS.
- b) Sentrifuge 12.000 rpm selama 15 menit.
- c) Supernatant dibuang (supernatant = PBS).
- d) Pelete ditambah chaps dengan perbandingan 1:1 divortex dengan waktu yang sama sampai homogen.
- e) Sentrifuge 12.000 rpm selama 15 menit
- f) Supernatant dikoleksi (supernatant = OMP)
- g) Kemudian OMP M. Tuberculosis disimpan dalam refrigerator suhu -20 derajat Celcius.

##### 4.8.2 Prosedur Elektroforesis SDS-PAGE

###### 1) Langkah I Pembuatan Gel

###### a) *Separating Gel*

- Acrylamide 30% 2063  $\mu$ l
- Tris-CL 1,5 M pH 8,8 1250  $\mu$ l
- dd.H<sub>2</sub>O 1635  $\mu$ l
- SDS 10% 50  $\mu$ l
- APS 10% 50  $\mu$ l
- Temed 10  $\mu$ l

###### b) *Stacking Gel*

- Acrylamide 30% 257,5  $\mu$ l

- Tris-CL 1,5 M pH 8,8 312,5  $\mu$ l
- dd.H<sub>2</sub>O 662,5  $\mu$ l
- SDS 10% 12,5  $\mu$ l
- APS 10% 37,5  $\mu$ l
- Temed 2,5  $\mu$ l

## 2) Langkah II *Sample Running*

- Siapkan protein yang akan *dirunning* (maksimal 20  $\mu$ l) ditambahkan RSB (Reducing Sample Buffer) dengan perbandingan 1 : 1.
- Panaskan protein + RSB dalam air mendidih (95<sup>o</sup>C) selama 5 menit untuk menonaktifkan enzim dan memutus rantai polimer protein.
- Masukkan sampel dalam sumur gel SDS-PAGE.
- Elektroforesis sampel pada 120 V selama 60 menit.
- Ambil gel dan warnai diatas shaker selama 20-30 menit.
- Gel diambil dan dibersihkan dengan asam asetat.

### 4.8.3 Prosedur Western Blot

- Rendam membran Nitroselulosa 7x9 cm dengan gel elektroforesis SDS PAGE masing-masing dalam transfer buffer simpan 30 menit di shaker
- Setting alat! Trans nlot semi dry. Susun sandwich urutan dari ke atas :
  - Kertas saring
  - Membrane NC
  - Gel SDS-PAGE
  - Kertas saring

Running pada 300mA, 20V selama 2 jam, untuk proses transfer pita protein dari gel SDS-PAGE ke membrane NC

- c. Angkat NC dan cuci dengan aquades rendam dalam ponceau  $\pm$  1-5 menit, dan bilas dengan aquades untuk konfirmasi keberhasilan transfer. Bloking dengan TBS skim milk 5% inkubasi overnight 4C di chumber.
- d. Keluarkan sampai mencapai suhu ruang dengan shaker
- e. Cuci NC dengan TBS-tween 0,05% 3x5 menit di shaker
- f. Inkubasi dengan Ab primer yang dilarutkan dalam TBS-tween selama 2 jam dalam suhu ruang
- g. Cuci NC dengan TBS-tween 0,05% 3x5 menit di shaker
- h. Inkubasi dengan Ab skunder-berlabel yang dilarutkan dalam TBS selama 1 jam dalam suhu ruang.
- i. Cuci NC dengan TBS-tween 0,05% 3x5 menit di shaker
- j. inkubasi dengan SHARP yang dilarutkan dalam TBS selama 40 menit pada suhu ruang
- k. Cuci NC dengan TBS-tween 0,05% 3x5 menit di shaker
- l. Inkubasi dengan sutrat (TMB membrane) sampai dengan muncul pita protein
- m. stop reaksi dengan aquades steril, keringkan membran NC dan scan.

#### 4.8.4 Prosedur Vaksinasi Subkutan

- a) OMP diencerkan sesuai jenis perlakuan. Perlakuan menggunakan OMP dengan berat molekul 71 kDa dengan konsentrasi 100  $\mu$ g dalam 100  $\mu$ l dalam PBS.
- b) Kemudian konsentrasi OMP yang diinjeksi sebesar 100  $\mu$ g OMP dalam 100  $\mu$ l dalam PBS. Total mencit yang diinjeksi adalah 9 ekor, dan setiap mencit

diinjeksikan dengan 0,1 ml, sehingga volume total yang dibutuhkan adalah 0,9. Dilakukan pengenceran menggunakan PSB dengan rumus :

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$100 . 1 = V2 . 1530$$

$$V2 = 0,065$$

Keterangan :

V1 = Volume OMP yang diambil (l)

V2 = Volume akhir setelah diencerkan

M1 = konsentrasi OMP hasil *nanodrop* (1,53 mg/ml atau 1,53 Molar)

M2 = konsentrasi yang ingin dicapai (100 µg dalam 100 µl atau 1 Molar)

#### 4.8.5 Prosedur Persiapan Hewan Coba

- a) Dilakukan pemeliharaan persiapan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, pakan *comfeed* (makanan standar mencit), hewan uji mencit galur BALB/c, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan).
- b) Tikus dibagi dalam dua kelompok.

#### 4.8.6 Prosedur Pembedahan

- a) Mencit dimasukkan kedalam toples berisi ether.
- b) Ditunggu hingga mencit tidak sadar.
- c) Setelah terbius, mencit dipindahkan ke papan pembedahan kemudian dibedah.
- d) Limpa diambil lalu dihomogenasi.
- e) Kemudian limpa disimpan pada suhu 4°C.

#### 4.8.7 Prosedur Persiapan Sampel untuk Flowcytometri (eBioscience, 2013)

- a) Limpa dimasukan ke dalam PBS + FBS 2% sebanyak 2 cc. Kemudian digerus dan disaring dengan cell strainer. Hasilnya kemudian dimasukan ke dalam falcon 15 cc. Kemudian dilakukan sentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang, dan peletnya ditambahkan PBS + FBS 2% 900  $\mu$ l. Kemudian diketuk-ketuk dan siap untuk distaining.
- b) Sampel membutuhkan 3,75  $\mu$ l antibodi CD4 yang telah diencerkan ke dalam 25  $\mu$ l PBS + FCS 2%.
- c) Kemudian ditunggu selama 30 menit lalu sampel dibaca di alat flowcytomerti.

#### 4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dari limpa menggunakan metode *flowcytometry*. Analisa data menggunakan analisa varian *Independent Sample t-Test* dengan  $p = 0,05$ .