

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina, berusia 2-3 bulan, berat badan 150-200 gram. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, maka jumlah hewan uji untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Christina, 2010).

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

$$(5n-1) - (5-1) \geq 16$$

$$5n - 1 - 4 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

$n = 5$; $p = 5$. Randomisasi dengan *simple random sampling*.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah antigen *cathepsin K* dan adjuvant (CFA-IFA) yang dibagi dalam kelompok:

- Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan perlakuan).

- Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan perlakuan).
- Kelompok 3: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan vaksinasi antigen *cathepsin K* 50 ng + CFA-IFA 100 µL /injeksi intraperitoneal.
- Kelompok 4: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan vaksinasi antigen *cathepsin K* 100 ng + CFA-IFA 100 µL /injeksi intraperitoneal.
- Kelompok 5: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan vaksinasi antigen *cathepsin K* 200 ng + CFA-IFA 100 µL /injeksi intraperitoneal.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah: titer antibodi *cathepsin K*

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

- Lokasi : Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia-Biomolekuler, Biomedik, Patologi Anatomi, Fisiologi, Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Waktu Penelitian : Januari s/d April 2012

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Perawatan Tikus

Alat: bak plastik berukuran 25 buah, tutup kandang terbuat dari anyaman kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, neraca Sartorius.

4.5.2 Ovariektomi

Alat: meja operasi kecil, baki plastik, *handscoen*, spuit 1 cc, alat cukur, duk steril, benang catgut, pisau tajam, jarum jahit, kasa steril, plester, *cotton bud*, kapas, kandang pemulihan. Bahan: ketamin, povidon iodine (betadine solution) dan alkohol 70%, basitrasin serbuk (Nebacetin), gentamisin inj, novalgin inj.

4.5.3 Pembuatan Vaksin *Cathepsin K*

Bahan: antigen *cathepsin K*, adjuvan (CFA-IFA), buffer konjugasi, peptide atau hapten, cairan protein karier, EDC, *deionized water*.

4.5.4 Injeksi Vaksin *Cathepsin K*

Alat: spuit 5 cc. Bahan: vaksin *cathepsin K*, adjuvan (CFA-IFA).

4.5.5 Pengukuran Titer Anti-*Cathepsin K* (IgG)

Alat: multichannel pipet, blue tip, yellow tip, white tip, mikropipet, vortex, tube, sentrifuge, ELISA reader. Bahan: PBS, BSA 1%, tween, Surblu TMB, antibodi *cathepsin K*, antibodi sekunder, coating buffer, dan HCL 1 N.

4.6 Definisi Operasional

- Ovariectomi: tindakan pembedahan berupa pengangkatan kedua ovarium hewan coba dengan tujuan mendapatkan model hewan coba dengan kondisi hipoeestrogen.
- Antigen *cathepsin K*: protein aktif terbanyak dan marker paling sensitif dalam proses resorpsi oleh osteoklas serta memiliki peran kunci dalam perusakan jaringan, *remodelling*, dan pemecahan kartilago tulang. Antigen *cathepsin K* ini didapat dari CV Gamma Scientific Biolab, Malang.
- *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik FK UB.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan Tikus

Tikus *Rattus norvegicus* dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Sebelum dilakukan ovariektomi, tikus terlebih dahulu ditimbang dengan neraca Sartorius.

4.7.2 Ovariektomi

Tikus difiksasi dalam posisi supinasi, kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin intramuskular (im) dengan dosis 40 mg/kgBB. Bulu abdomen dicukur, lalu dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70% dan larutan betadin. Setelah itu ditutup duk steril. Dilakukan insisi transabdominal kira-kira di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Selanjutnya *oviduct* bagian distal dan ovarium diligasi, kemudian *oviduct* dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kiri dan kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut, kemudian diolesi povidone iodine dan Nebacetin, ditutup kasa steril. Kemudian diberikan Gentamycin i.m dengan dosis 60 – 80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari (Christina, 2010).

4.7.3 Injeksi Vaksin *Cathepsin K*

Vaksin diinjeksikan secara intraperitoneal (*cathepsin K* + CFA-IFA 100 μ L ip). CFA diberikan pada saat injeksi pertama, sedangkan IFA diinjeksikan sebagai *booster* setiap 2 minggu sekali sebanyak 2 kali *booster*.

4.7.4 Pengukuran Titer Anti-Cathepsin K

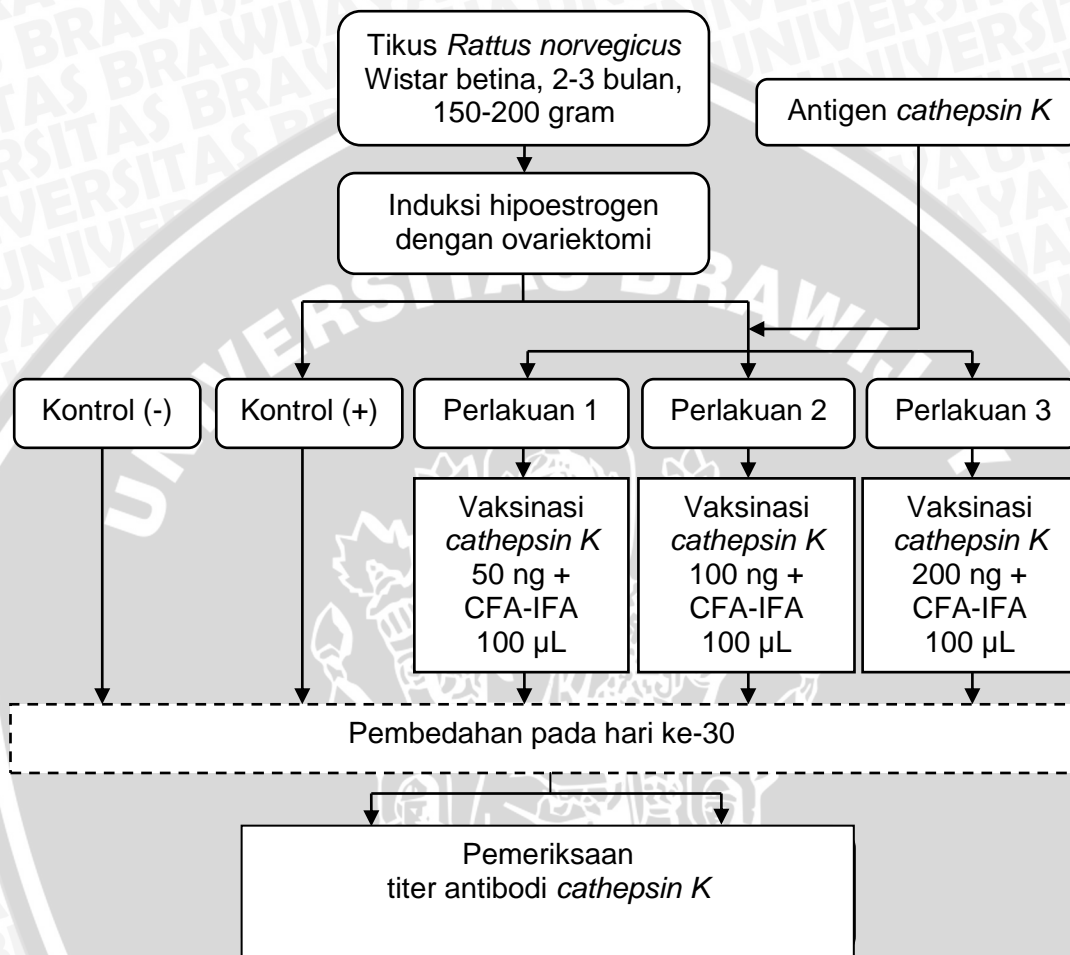
Pengukuran titer antibodi anti-cathepsin K dengan ELISA. Antigen didilusi dalam *coating buffer* (50 μ L/well) (1:1), tutup *plate* dan inkubasi pada suhu 4°C semalam. Cuci *plate* 3x dengan PBS 50 μ L. Blok *protein-binding site* dalam *coated well* dengan menambahkan 50 μ L *blocking buffer*, 5% *non fat dry milk* atau 5% serum (BSA) dalam PBS untuk tiap *well*, tutup *plate* dengan plastik dan inkubasi 2 jam pada suhu ruang. Cuci *plate* dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan 50 μ L serum (antibodi primer) untuk setiap *well*, tutup *plate* dengan plastik dan inkubasi 2 jam pada suhu ruang. Cuci *plate* dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan 50 μ L antibodi sekunder terkonjugasi (*anti-mouse biotin conjugate*), tutup *plate* dengan plastik dan inkubasi 1-2 jam pada suhu ruang. Cuci *plate* dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan enzim SA-HRP, inkubasi 1 jam pada suhu ruang. Tambahkan 50 μ L *substrat solution* untuk tiap *well*. Setelah muncul warna, tambahkan 50 μ L *stop solution* tiap *well*. Baca *optical density* dengan ELISA reader ($\lambda=450\text{nm}$).

4.8 Analisa Statistik

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisis dengan menggunakan program SPSS 16,0 for Windows XP dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc test* (Dahlan, 2004).

4. 9 Desain Penelitian

Desain penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 4.9 Desain Penelitian