

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*. Desain penelitiannya adalah sebagai berikut :

4.2 Variabel Penelitian

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah antibodi beta amyloid yang dihasilkan oleh kelinci dengan antigen beta amyloid.
- Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya ikatan antigen-antibodi beta amyloid pada dot blot dan ELISA.

4.3 Sampel Penelitian

- Sampel penelitian adalah 2 ekor kelinci jantan albino. Kelinci digunakan untuk memproduksi antibodi beta amyloid karena kelinci paling umum digunakan dalam produksi antibodi poliklonal, disamping lebih murah, serta mudah perawatannya. Secara umum, apabila hubungan filogenetik semakin jauh, maka potensi titer antibodi bisa tinggi.

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium Fisiologi FKUB, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya.

4.5 Definisi Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan sebagai produsen antibodi dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan berusia 12-16 minggu yang dibeli dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- *Beta-amyloid human peptide*: antigen berupa protein beta amyloid dari manusia yang dimurnikan dan digunakan untuk menginduksi terbentuknya antibodi beta amyloid pada kelinci yang dibeli dari US BIO.
- Complete Freund's Adjuvant (CFA) dan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian antigen pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian (*booster*) selanjutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Antibodi beta-amyloid : antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi ke dalam tubuh kelinci. Pengecekan kadar antibodi yang terbentuk dengan metode ELISA dan Dot Blot.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perawatan kelinci

Kelinci jantan albino 2 ekor, kandang 80 cm x 40 cm x 30 cm 2 buah, terbuat dari kayu, botol air dan tempat makan masing-masing 2 buah, pakan 3 karung, anti-gudig oles.

2. Produksi Antibodi beta-amyloid

Beta-amyloid human peptide 100 µl, 20 ml Tris-Cl pH 6,8, PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 100 ml, Vacutainer Heparin 4 ml, *disposable*

sput 3 ml, Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml.

3. Purifikasi Antibodi beta-amyloid

Centrifuge tube 1.5 ml, blue tips, Sentrifuge dingin-Low RPM (Hettich), Membran dialisis 25 ml x 1, Natrium Karbonat, Amonium sulfat (Merk), EDTA, Natrium Klorida, Di-kalium Hidrogen Fosfat, Di-natrium Hidrogen Fosfat, Selovan, Aquadest steril, Handscone.

4. Pendeteksian Antibodi beta-amyloid

Membrane NC, Dot Blotter Aparatus, Micropipet, Shaker, Antigen Beta Amyloid 60 ppm, Buffer TBS – NAN3, Yellow tips, Blue tips, Tris HCL pH 8,8 (50 ml), Skim milk, Tween 20, Tris-base, Membran Nitrocellulose, Ponceau (100 ml)/WB, IgG anti rabbit, SA-HRP, TMB Membrane, Sentrifuge RT, ELISA Plate, BSA, TMB microwell peroksidase, ELISA Reader, PBS steril.

4.7 Prosedur Penelitian

1. Produksi Antibodi beta-amyloid

Antibodi merupakan hasil respon tubuh terhadap benda asing (antigen) yang masuk dalam tubuh, namun berada diluar sel. Antibodi poliklonal merupakan kombinasi molekul imunoglobulin (Ig) yang dihasilkan terhadap beberapa antigen tertentu, dimana setiap antigen akan dikenali oleh tempat perlekatan (*epitope*) yang berbeda namun masih dalam satu imunoglobulin. Secara umum, apabila hubungan filogenetik semakin jauh, maka potensi titer antibodi bisa tinggi. Kelinci muda dengan umur 10-16 minggu digunakan, dengan harapan maternal

IgG semakin tidak terdeteksi. Selain itu, puncak fungsi imun pada kelinci terjadi sewaktu masa pubertasnya. Metodenya (Florida State University, 2007):

1. 200 µl protein *beta-amyloid human peptide* yang telah diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl diemulsikan dengan *Freund's complete adjuvant* (CFA) (Sigma) dalam jumlah yang sama dan diinokulasikan secara intramuskuler (IM) pada 2 kelinci jantan(4 bulan).
 2. Dua minggu setelah penginjeksian awal, dilakukan booster pertama menggunakan 200 µl dari protein *beta-amyloid human peptide* yang telah diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl, diemulsikan dengan *Freund's incomplete adjuvant*(IFA) (Sigma) dalam jumlah yang sama dan diinokulasikan secara intramuskuler (IM).
 3. Satu minggu setelah *booster* pertama, pengambilan darah (panen) sudah dapat dilakukan. Panen dilakukan hingga minggu kelima setelah *booster* 1. Setelah imunisasi terakhir, sampel darah diambil dari kelinci dan produksi antibodi diidentifikasi melalui Dot Blot dan tes ELISA (diterima oleh Regional Medical Sciences Research Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences).
2. Purifikasi Antibodi beta-amyloid
1. Darah dipanen melalui vena *auricularis* dan dikoleksi serumnya untuk menyiapkan antibodi (IgG).
 2. Antibodi dalam serum dipurifikasi menggunakan metode SAS 50 (*Saturated Ammonium Sulphate 50%*) guna mendapatkan konsentrat IgG poliklonal (Liddell, 2003).

3. Pendeteksian Antibodi beta-amyloid

1. Dot Blot (Abcam,2010)

Dot blot merupakan suatu metode yang dapat digunakan dalam mengamati ikatan antigen dan antibodi secara kualitatif menggunakan perbedaan gradasi warna yang dihasilkan oleh ikatan antigen dan antibodi. Melalui pengamatan secara kualitatif menggunakan dot blot diharapkan dapat diamati apabila terdapat peningkatan ikatan antara antibodi dan antigen pada minggu pertama dibandingkan dengan antibodi pada minggu ke-3. Secara detail, metode dot blot adalah : Antigen dalam TBS – sodium azida (NaN₃) 0.02% diencerkan dengan perbandingan 1:4. Membran NC dirangkai pada alat blotter *Bio-Rad* (tutup well yang tidak terpakai dengan menggunakan isolasi). Membran NC dibasahi dengan 50 µl/well TBS. TBS dibuang dan tapping pada *tissue*. Antigen dimasukkan ke membran NC pada 50 µl/well. Kemudian, diinkubasi *overnight* pada suhu 4⁰C. Membran NC plus antigen diblokir dengan TBS – *Skim Milk* 5% (atau TBS-BSA 2%), Inkubasi selama 1 sampai 3 jam. Dicuci dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 pada 50 µl/well. Selanjutnya, ditetesi dengan Ab primer (Ab₁) yang diencerkan dalam TBS dengan perbandingan 1 : 2000, pada 50 µl/well. Kemudian, diinkubasi selama 2 jam sambil digoyang pelan-pelan. Dibiarkan *overnight* pada suhu 4⁰C. Dicuci lagi dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 menit pada 50 µl/well. Selanjutnya, ditetesi Ab sekunder (Ab_{II}) yang diencerkan dalam TBS dengan perbandingan

(1 : 2500) pada 50 μ l/well. Kemudian, diinkubasi selama 1 jam sambil digoyang pelan-pelan.

Dicuci lagi dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 menit pada 50 μ l/well. Kemudian, ditetesi dengan substrat *western blue* pada 50 μ l/well (*dark condition*). Inkubasi selama 30 menit sambil digoyang pelan-pelan (bungkus alat dengan aluminium foil). Reaksi dihentikan dengan aquades pada 100 μ l/well beberapa saat NC dikeringkan dan dianginkan.

2. Indirect ELISA (Abcam, 2010)

Untuk memastikan imunogenitas dari beta-amyloid, selain itu untuk dapat melihat kadar titer antibodi beta amyloid secara kuantitatif. Dilihat hubungan antara beta amyloid *human peptide* terhadap antibodi beta amyloid menggunakan metode *indirect ELISA (Enzyme Link Immuno Sorbent Assay)*. Secara detail, metodenya : Sentrifugasi sampel darah kelinci, encerkan supernatan dengan *assay buffer* dengan perbandingan 1 : 10, 10 μ L sampel + 90 μ L *assay buffer*. Hasil kemudian dimasukkan ke dalam mikroplate ELISA, diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan 50 μ L bloking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali selama 5 menit. Inkubasi dengan 100 μ l antibodi primer (anti beta amyloid) dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1 : 500 selama 2 jam. Suspensi diambil dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 3 Kali selama 5 menit, dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam *tris buffer saline* dengan

perbandingan 1 : 2500 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween selama 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 50 μ L Biotin dan diinkubasi selama 30 menit. Kemudian, dicuci dengan PBS-Tween selama 2 kali 5 menit. Substrat TMB dimasukkan dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan NAOH 1 N selama 15 menit. Hasil dibaca pada ELISA reader dengan λ 450 nm.

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah perlakuan pengambilan darah kelinci dari minggu ke-1 sampai minggu ke-5. Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya untuk mengetahui ikatan antibodi dan antigen secara kualitatif dan kuantitatif pada hasil ELISA dan dot blot. Hasil analisa secara kuantitatif melalui ELISA akan diterjemahkan kedalam tabel untuk mengetahui tingkat imunogenitas dari protein beta amyloid.