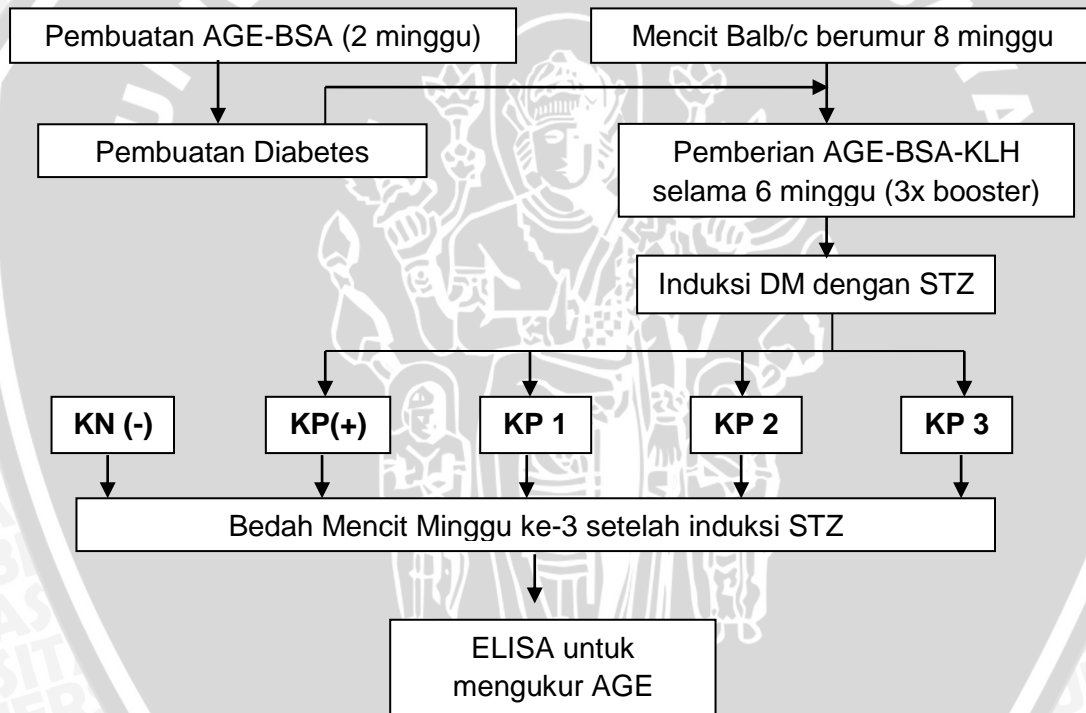


BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Desain Penelitian adalah sebagai berikut:



4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas Penelitian

Vaksin diabetes mellitus dengan menggunakan berbagai bahan yaitu KLH, AGE-BSA-KLH dan AGE-BSA-KLH yang dibagi dalam kelompok:

1. KN (-): kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan induksi STZ dan tanpa diberikan vaksinasi).
2. KP (+): kelompok kontrol positif (mencit yang diberikan induksi STZ tanpa diberikan vaksinasi).
3. KP1: kelompok mencit yang diberikan vaksinasi KLH 100 µl/ injeksi lalu diberikan STZ.
4. KP2: kelompok mencit yang diberikan vaksinasi AGE-BSA 100 µl/ injeksi lalu diberikan STZ.
5. KP3: mencit yang diberikan vaksinasi AGE-BSA-KLH 100 µl/ injeksi lalu diberikan STZ.

4.2.2 Variabel Tergantung Penelitian

1. Kadar glukosa darah mencit
2. Kadar AGE serum mencit

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Subjek dan Kriteria Inklusi Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/C jantan. Pemakaian mencit sebagai hewan coba yang mudah ditangani, mudah dipelihara dan mudah berkembangbiak. Kriteria mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Termasuk galur Balb/C
2. Jenis kelamin jantan
3. Umur 6-8 minggu
4. Berat badan 20-25 gram
5. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif.

4.5 Estimasi Besar Sampel

Selanjutnya jumlah mencit dihitung dengan rumus (Indra, 1999)

$$p(n-1) > 15$$

Dimana: n = jumlah sampel tiap perlakuan

$$p = \text{jumlah perlakuan}$$

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negative, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15$$

$$n-1 > 3$$

$$n > 4$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor mencit sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 25 mencit. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena mencit mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan, total mencit yang digunakan yaitu 30 (Sudigdo, Sofyan, 2008).

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c jantan berusia 8 minggu yang dibeli dari Pusvetma Surabaya.
2. Streptozotocin: pemberian streptozotocin dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya diabetes mellitus dengan merusak sel beta pancreas.
3. AGE-BSA merupakan bentuk *Advanced Glycation End Product* diperoleh dengan mereaksikan glukosa menggunakan metode Gasic-Milenkovic *et al.*,(2003)
4. KLH: KLH digunakan sebagai protein karier, didapat dari CV Cristallindo Surabaya
5. EDC: EDC merupakan crosslinker yang mampu mengikat KLH dan AGE-BSA sehingga didapatkan ikatan yang stabil, didapat dari CV Cristallindo Surabaya
6. Freund's Complete Adjuvant (CFA) dan Freund's Incomplete Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit

Bahan dan alat yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *cornfeed* (makanan standar mencit), dan alkohol 70% untuk memandikan mencit yang disemprotkan tiap hari.

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Mencit

Alat: pisau bedah, papan bedah, pinset, Potter-*Homogenizer*. Bahan: PBS.

4.7.3 Alat untuk Pencegahan Infeksi

Alat: tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, *cotton ball*. Bahan: alkohol.

4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan AGE-BSA

BSA, 1 M glukosa , 100 mM PBS.

4.7.5 Alat dan Bahan Konjugasi dan Koupling Protein Karier

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 2 mg, MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) pH 4.5-5.0 M, EDC 10 mg, Hapten: larutkan 1-2 mg dari hapten dalam coupling buffer, Purification buffer: 0.083 M sodium phosphate, 0.9 M NaCl, pH 7.2. A 10 ml D-Salt™.

4.7.6 Penambahan Adjuvan

Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml

4.7.7 Alat dan Bahan untuk Mengukur Kadar AGE dalam Serum Mencit

Alat: Anti-AGE ELISA Kit, tabung *polypropylene*, *microplate*, *well plate*, spuit insulin 1cc, vacutainer heparin tube.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji mencit galur Balb/C, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan).Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium parasitologi selama tujuh hari.

4.8.2 Pembuatan Antigen AGE-BSA

Glycated Bovine Serum Albumin (AGE-BSA) diproduksi dengan metode yang telah dilakukan oleh Gasic-Milenkovic (Gasic-Milenkovic *et al.*, 2003). 1 mM BSA diinkubasi dengan 1 M glukosa dalam 100 mM PBS, dengan pH 7,4 selama 6 minggu pada suhu 50°C. Glukosa yang berlebihan dibuang dengan cara didialisis dengan PBS.

4.8.3 Pemberian perlakuan

Mencit diinjeksi KLH, AGE-BSA, AGE-BSA-KLH dilakukan secara intraperitoneal. Hari pertama injeksi diberikan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan pada 2 minggu selanjutnya dilakukan injeksi IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) tiap dua minggu sebagai booster selama 4 minggu. Setelah itu dilakukan pembedahan mencit dan pengambilan darah intracardial.

4.8.4 Induksi Diabetes Mellitus Tipe II

Pada hari 14 setelah injeksi KLH, AGE-BSA, AGE-BSA-KLH ,STZ (Streptozotocin) dimasukkan kedalam 50mM-citric acid buffer dan Nicotinamide

dileburkan kedalam normal salin saat akan digunakan. Mencit Balb/c dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal 100 mg/kg. Kerusakan Beta Pankreas ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemi pada hari ke-7 pasca induksi.

4.8.5 Pengukuran Ekspresi AGE serum dengan Metode ELISA

Isolasi darah dari mencit melalui injeksi intra-cardial, simpan dalam vacutainer heparin untuk mencegah koagulasi. Masukkan darah kedalam eppendorf, sentrifugasi 2000rpm lalu setelah sel darah merah mengendap, ambil serum. Sentrifugasi serum, encerkan serum dengan *Assay buffer* dengan perbandingan 1:10, 10 μ L Sampel + 90 μ L *Assay Buffer*. Hasil kemudian dimasukkan kedalam mikroplate ELISA diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama semalam. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Penambahan 50 μ L blocking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Pencucian reagen dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 μ l antibodi primer dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1:500 selama 2 jam. Suspensi diambil dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 3 Kali @5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam tris buffer salin dengan perbandingan 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween selama 2 @ 5 menit. Penambahan 50 μ L substrat pNPP dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dicuci dengan PBS-Tween selama 2 @ 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 405 nm.

4.8.6 Analisis Data

Hasil pengukuran AGE serum dan grade morfologi endotel aorta kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows XP* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : Uji normalitas data, Uji homogenitas varian , Uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test* (*uji Least Significant Difference*), Uji korelasi *Pearson*.

