

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *true experimental laboratory* dan metode *randomized posttest only controlled group design* yang melihat efek imunisasi antigen AGE dalam patogenesis nefropati diabetik.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB, dan pemeriksaan variabel dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB. Waktu penelitian pada bulan Mei-September 2014.

#### 4.3. Sampel Penelitian

##### 4.3.1 Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit galur Balb/C.

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat *intake* bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.
2. Kriteria eksklusi: mencit kelompok diabetes yang tidak mencapai kondisi hiperglikemia dan mati selama perlakuan

##### 4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung dengan rumus:

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

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan ( $p$ ) = 4, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 2 kelompok perlakuan:

$$\begin{aligned} 4(n-1) &\geq 15 \\ n-1 &\geq 3,75 \\ n &\geq 4,75 \\ n &\geq 5 \end{aligned}$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel untuk tiap perlakuan adalah minimal 5 ekor mencit. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena mencit mati, maka jumlah sample ditambah 1 tiap perlakuan sehingga total mencit yang digunakan adalah 24 ekor.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini meliputi:

1. Pemberian AGE-BSA
2. Pemberian Induksi diabetes dengan STZ

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kadar glukosa darah acak
2. Kadar protein urin
3. Luas area membran filtrasi

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Diabetes yang mampu menginjuri ginjal pada ginjal ditandai dengan kadar glukosa darah > 280 mg/dL (Rangan dan Tesch, 2007), proteinuria yang menetap(>0,5gr/24jam), hipertrofi glomerulus (volum glomerulus yang membesar dan ekspansi mesangial yang tinggi)

2. Imunisasi: imunisasi yang digunakan berasal dari AGE-BSA. Jenis imunisasi tersebut untuk mengetahui dampak langsung terhadap kadar AGE, imunisasi AGE yang spesifik terhadap AGE.
3. Kelompok imunisasi AGE tanpa induksi diabetes: untuk mengetahui pengaruh imunisasi AGE terhadap mencit normal, apakah bersifat merugikan atau tidak memiliki pengaruh.
4. Induksi diabetes: menggunakan dua metode. Metode pertama injeksi tunggal STZ 100 mg/kgBB dan diobservasi selama enam minggu. Pada minggu ketujuh dilanjutkan injeksi *multiple dose* 40 mg/kgBB selama lima hari berturut-turut dan diobservasi selama lima minggu. Mencit dibedah pada minggu keenam post injeksi STZ terakhir.
5. Prosedur pemberian AGE-BSA: yaitu Kelompok yang mendapatkan preimunisasi (Kelompok B dan D) mendapatkan injeksi AGE-BSA masing-masing 50 $\mu$ g dalam PBS yang diemulsikan dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 (volume total 100 $\mu$ L) secara i.p. Dilanjutkan 2x booster dengan dosis yang sama menggunakan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan jarak 2 minggu tiap imunisasi.
6. Prosedur pemberian STZ: Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dua kali ulangan. Injeksi pertama dengan dosis tunggal 100mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) pada dua minggu setelah booster imunisasi terakhir. Dosis kedua diinjeksikan pada minggu ke-7 setelah injeksi pertama dengan dosis multiple 40mg/kgBB selama lima hari berturut-turut untuk menginduksi komplikasi vaskuler (nefropati diabetik) (Wu dan Huan, 2008). BB mencit diukur setiap sebelum pemberian injeksi STZ untuk menentukan dosis STZ yang tepat. Gula darah acak (GDA) diukur setiap satu minggu setelah injeksi STZ terakhir dan sebelum pembedahan.
7. Prosedur pengukuran glukosa darah: kadar glukosa darah diukur dengan menggunakan *glucometer* yaitu pada saat pre-imunisasi (kelompok A,B,C,D), pre-

booster 1(kelompok B dan D), pre-STZ(kelompok B dan D), post-STZ minggu ke-6, ke-7, ke-9(kelompok A,B,C,D) dan setelah pembedahan(kelompok A,B,C,D).

8. Prosedur pengukuran protein urin: Kadar protein total dalam urin diukur secara spektrofotometri dengan Metode Lowry. Stok standar dari BSA 10mg/ml disiapkan untuk dibuat standar BSA dengan beberapa konsentrasi berseri (volum total 1 mL). Sampel yang akan diukur diencerkan dengan volum yang sama dengan standar (10 $\mu$ L sampel+310 $\mu$ L PBS). Masing-masing standar dan sampel ditambahkan reagen Alk. CuSO<sub>4</sub> 2mL kemudian divortek, dilanjutkan dengan penambahan folin 200 $\mu$ L, diinkubasi di inkubator 37°C selama 30 menit. Diukur di spektrofotometer pada panjang gelombang 595nm dalam 2-60 menit setelah penambahan reagen.

9. Prosedur pengukuran luas area membran filtrasi: untuk mengetahui area membran filtrasi diperlukan penghitungan dengan rumus:

$100\% - ((\text{area mesangial} / \text{area glomerulus}) \times 100\%) = \dots \%$ . (Rangan dan Tesch,

2007). 40 gambar glomerulus dari tiap mencit dikumpulkan untuk mendapat hasil yang objektif, sehingga pada penelitian ini menggunakan 800 gambar glomeruli.

Untuk mendapatkan gambar khusus glomerulus, gambar diedit terlebih dahulu melalui program *photoshop* atau *coreldraw* dengan format JPG atau PNG.

Langkah awalnya adalah mengukur area glomerulus (AG) dengan menggunakan ImageJ *software*. Langkah pertama adalah membuka ImageJ Software →

membuka gambar yang spesifik 1 glomerulus (perbesaran 400 x). Setelah membuka *image*, penentuan AG menggunakan *polygon* atau *freehand*. Setelah

area yang diinginkan dipilih, hasil AG dapat diketahui dengan memilih menu *Analyze* → *Measure* kemudian akan muncul data pengukuran (*result window*).

Hasil AG terdapat pada kolom area. Setelah mendapat area glomerulus, langkah berikutnya adalah mengukur area mesangial (AM), penentuannya hampir sama

dengan area glomerulus dengan menentukan area yang diinginkan dengan menggunakan *freehand* atau *polygonal*.

## 4.6 Alat dan Bahan

### 4.6.1 Bahan

AGE-BSA didapatkan dari BioVision (Milpitas Boulevard, Milpitas, CA). CFA, IFA, dan STZ didapatkan dari Sigma Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO). Antibodi poliklonal rabbit anti-AGE mouse didapatkan dari Abcam (Cambridge, MA). Antibodi sekunder untuk imunohistokimia menggunakan HRP Universal Kit (berisi *biotinylated secondary antibody* dan *HRP-labeled-streptavidin*) didapatkan dari Biocare Medical LLC.

### 4.6.2 Alat

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini dijelaskan dalam tabel 4.6.2 di bawah ini.



Tabel 4.6.2 Alat Penelitian

No	Nama Alat	Lokasi	Kegunaan	Kemampuan
1	Ruang pemeliharaan hewan coba	Lab. Farmakologi	Pemeliharaan mencit	Baik
2	Sentrifugator	Lab. Biomedik	Persiapan serum	Baik
3	Spektrofotometer	Lab. Biomedik	Pengukuran kadar proteinuria	Baik

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat pakan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan coba mencit galur Balb/C, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Mencit dikandangkan individual, mendapatkan pakan *comfeed* standar, dan akses minum bebas. Mencit diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi FKUB selama tujuh hari sebelum eksperimen.

##### 4.7.2 Pemberian Imunisasi

Kelompok yang mendapatkan preimunisasi (Kelompok B dan D) mendapatkan injeksi AGE-BSA masing-masing 50 $\mu$ g dalam PBS yang diemulsikan dengan *Complete Freund's Ajuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 (volume total 100 $\mu$ L) secara i.p. Dilanjutkan 2x booster dengan dosis yang sama menggunakan *Incomplete Freund's Ajuvant* (IFA) dengan jarak 2 minggu tiap imunisasi.

##### 4.7.3 Induksi Diabetes

Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dua kali ulangan. Injeksi pertama dengan dosis tunggal 100mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p) pada dua minggu setelah booster imunisasi terakhir. Dosis kedua diinjeksikan pada minggu ke-7 setelah injeksi pertama dengan dosis multiple 40mg/kgBB selama lima hari berturut-turut untuk menginduksi komplikasi vaskuler (nefropati diabetik) (Wu dan Huan, 2008). BB mencit diukur setiap

sebelum pemberian injeksi STZ untuk menentukan dosis STZ yang tepat. Gula darah acak (GDA) diukur setiap satu minggu setelah injeksi STZ terakhir dan sebelum pembedahan.

#### 4.7.4 Evaluasi Nefropati diabetik

Pada minggu ke-5 setelah injeksi STZ kedua dilakukan pembedahan mencit. Evaluasi nefropati diabetik diukur dari tingkat kadar glukosa darah dan proteinuria antar kelompok pada akhir penelitian. Proteinuria diukur dari urin acak mencit yang diambil satu hari sebelum dan saat pembedahan.

#### 4.7.5 Pengukuran Proteinuria

Kadar protein total dalam urin diukur secara spektrofotometri dengan Metode Lowry. Stok standar dari BSA 10mg/ml disiapkan untuk dibuat standar BSA dengan beberapa konsentrasi berseri (volum total 1 mL). Sampel yang akan diukur diencerkan dengan volum yang sama dengan standar (10 $\mu$ L sampel+310 $\mu$ L PBS). Masing-masing standar dan sampel ditambahkan reagen Alk. CuSO<sub>4</sub> 2mL kemudian divortek, dilanjutkan dengan penambahan folin 200 $\mu$ L, diinkubasi di inkubator 37°C selama 30 menit. Diukur di spektrofotometer pada panjang gelombang 595nm dalam 2-60 menit setelah penambahan reagen.

#### 4.7.6 Pengukuran Area Membran Filtrasi

Untuk mengetahui area membran filtrasi diperlukan penghitungan dari volume area mesangial (EM) dibagi dengan area *tuft* glomerulus, dikali 100%. Hasil dari pengukuran ini merupakan area non filtrasi. Sehingga untuk mendapatkan membran filtrasi adalah dengan 100% dikurangi hasil area non filtrasi. 40 gambar glomerulus dari tiap mencit dikumpulkan untuk mendapat hasil yang objektif, sehingga pada penelitian ini menggunakan 800 gambar glomeruli.

Untuk mendapatkan gambar khusus glomerulus, gambar diedit terlebih dahulu melalui program *photoshop* atau *coreldraw* dengan format JPG atau PNG. Langkah awalnya adalah mengukur area glomerulus (AG) dengan menggunakan ImageJ *software*. Langkah pertama adalah membuka ImageJ Software → membuka gambar yang spesifik 1 glomerulus (perbesaran 400 x). Setelah membuka *image*, penentuan AG menggunakan *polygon* atau *freehand*. Setelah area yang diinginkan dipilih, hasil AG dapat diketahui dengan memilih menu *Analyze* → *Measure* kemudian akan muncul data pengukuran (*result window*). Hasil AG terdapat pada kolom area.

Setelah mendapat area glomerulus, langkah berikutnya adalah mengukur area mesangial (AM), penentuannya hampir sama dengan area glomerulus dengan menentukan area yang diinginkan dengan menggunakan *freehand* atau *polygonal*.

Setelah mendapatkan hasil area glomerulus dan area mesangial, maka dapat diketahui hasil area non filtrasi yaitu dengan rumus  $AM = [\text{area mesangial} / \text{area glomerulus}] \times 100\%$  (Rangan dan Tesch, 2007). Langkah terakhirnya adalah pengukuran area filtrasi (membran filtrasi) yaitu dengan  $100\% - \text{hasil area non filtrasi dengan hasil dalam persen}$ .

Rumus:

$$100\% - ((\text{area mesangial} / \text{area glomerulus}) \times 100\%) = \dots \%$$

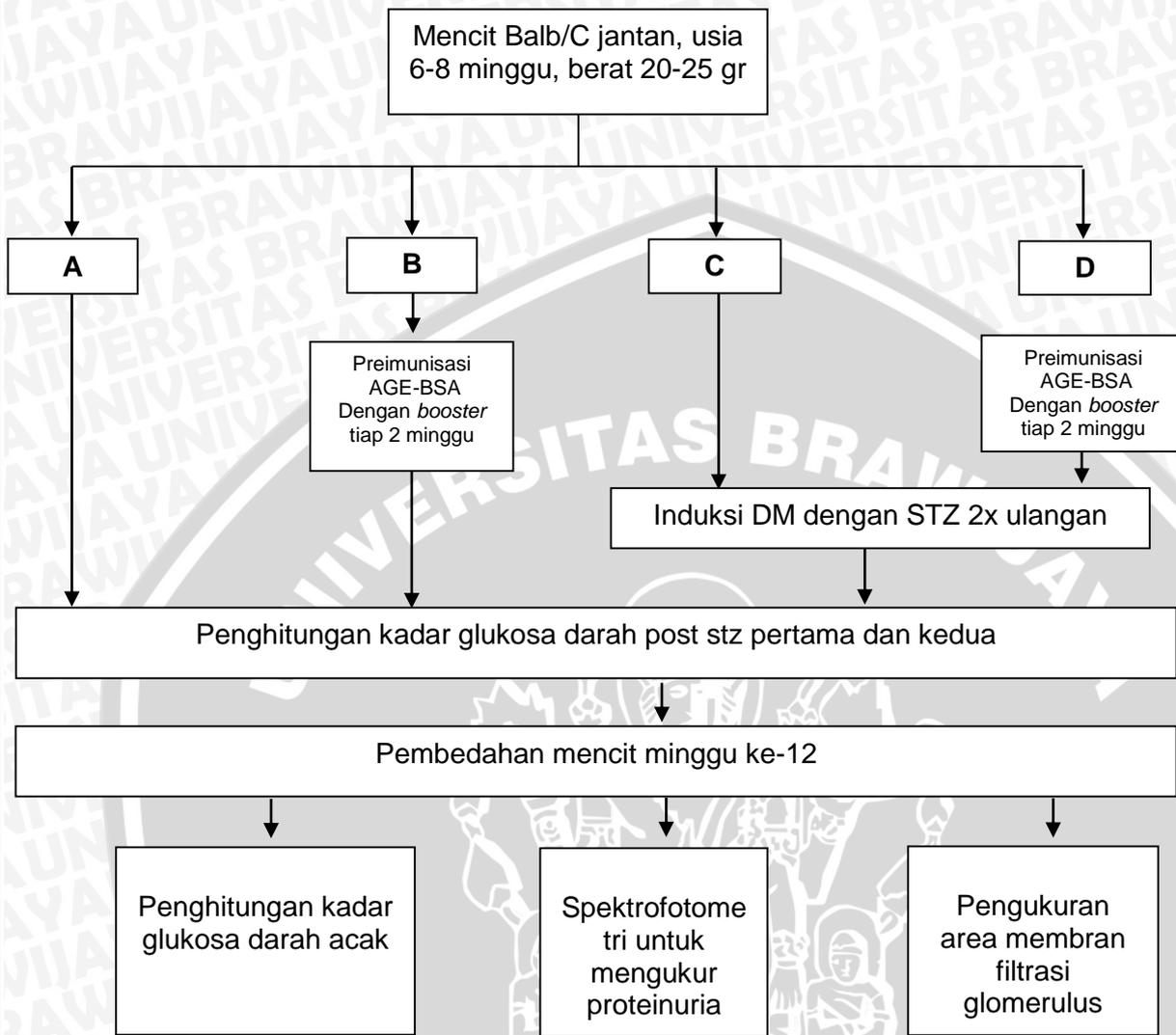
#### 4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran glukosa darah acak, proteinuria, area membran filtrasi 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 adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, dan *Post hoc test (uji Least Significant Difference)*.



## 4.9 Skema Penelitian



Gambar 4.9 Skema Penelitian