

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dengan menggunakan uji SDS-Page untuk melihat keberadaan IgY dan uji dot blot untuk melihat efektivitas IgY terhadap antigen bakteri *P. gingivalis*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *P. gingivalis* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.

Banyaknya pengulangan yang dilakukan didapatkan dengan perhitungan rumus. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan yang berbeda, maka didapatkan pengulangan sebanyak (Solimun, 2001):

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

$$4 (n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19 \rightarrow n \geq 4,75 \approx 5$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Jadi, pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian IgY dengan berbagai macam konsentrasi.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah pertumbuhan koloni bakteri *P. gingivalis*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomed Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Februari 2015 sampai Juni 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada imunisasi antigen *P. gingivalis* dan ekstraksi antibodi IgY adalah:

- 1) Hewan coba ayam petelur *Single Comb Lenghorn* berumur 24 minggu sebanyak 4 ekor
- 2) Isolat utuh bakteri *P. gingivalis*
- 3) PEG 6000 (Merck)
- 4) Na azide (Merck)
- 5) *Phenol red*
- 6) Amonium sulfat (Merck)
- 7) Spektrofotometer
- 8) *Freud's adjuvant*
- 9) Agargose (Sigma)
- 10) *Brain heart infusion* (BHI)

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk uji Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylmide Gel Elektrophoresis (SDS-Page) adalah:

- 1) Mikrotube
- 2) Mikropipet
- 3) Yellow tip
- 4) Spin down scanner
- 5) Botol flacon
- 6) 12,5% ddH₂O sebanyak 1263,5 μ L
- 7) Akrilamid sebanyak 1861,5 μ L
- 8) Tris Cl ph 8,8 sebanyak 1125 μ L
- 9) SDS 10% sebanyak 75 μ L
- 10) APS 10% sebanyak 75 μ L
- 11) Temed sebanyak 5 μ L
- 12) Tris Cl ph 6,8 sebanyak 0,38 ml
- 13) Stok bisoakrilamid 30% sebanyak 0,45 ml
- 14) SDS 10% sebanyak 30 μ L
- 15) APS 10% sebanyak 30 μ L
- 16) Temed sebanyak 5 μ L
- 17) Sampel protein
- 18) Marker astein
- 19) RSB sebanyak 10 μ L (mengandung Tracking dye, gliserol dan beta marcopto etanol 2%, kemudian serum ditambahkan dengan RSB 1:1)

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk uji Dot Blot adalah:

- 1) Membran nitroselulosa (NC)
- 2) Bio-Dot Apparatus Bio-Rad
- 3) H₂O
- 4) TBS

- 5) Tris buffer salin pH 7,4
- 6) Blocking buffer TBS (mengandung Tris Base 50 mM, NaCl 0,1 M, Skim milk 5%, pH 7,4)
- 7) Shaker
- 8) TBS Twen-20 0,005%
- 9) NaN₃
- 10) Substrat Western Blue

4.6 Definisi Operasional

1. IgY atau *yolk immunoglobulin* merupakan immunoglobulin ayam yang terkena paparan antigen kemudian ditransfer dari darah ayam ke dalam kuning telur sebagai perlindungan terhadap embrio dan janin hingga 7-10 hari setelah menetas (Poetry, 2006).
2. Isolat *P. gingivalis* diperoleh dari isolat standar Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari tiga tahap penelitian, yaitu isolasi protein bakteri, imunisasi antigen *P. gingivalis* dan isolasi antibodi protein IgY, kemudian tahapan yang terakhir adalah uji imunogenitas dari protein IgY dengan uji SDS-Page dan uji Dot Blot.

4.7.1 Isolasi Protein Bakteri

Isolasi protein *P.gingivalis* menggunakan metode SDS-Page. Sebagai persiapan uji SDS-Page, dilakukan pembuatan *stacking gel*, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan *resolving gel*. Setelah itu resolving gel dengan segera dituangkan ke dalam casing dengan menggunakan pipet. Diisikan sampai

pada garis di bagian atas casing. Kemudian tambahkan EtOH pada bagian atas gel. Diamkan selama \pm 30 menit untuk membuat gel terpolimerisasi. Untuk mempercepat polimerisasi, dapat ditambahkan EPS dan TEMED ke dalam campurannya. Setelah resolving gel selesai, larutkan EtOH. Kemudian bilas dengan aquadest. Stacking gel yang telah siap diletakkan di atas solving gel. Dibutuhkan 2 ml larutan untuk dapat memenuhi solving gel. Diamkan selama \pm 30 menit untuk membuat gel terpolimerisasi, dan untuk mempercepat polimerisasi dapat ditambahkan EPS dan TEMED ke dalam campuran. Setelah campuran untuk membuat gel polyacramyde selesai, dapat dilanjutkan dengan proses elektroforesis yang dapat digunakan untuk memastikan bahwa protein yang didapatkan adalah dinding sel bakteri *P.gingivalis*

4.7.2 Imunisasi Antigen *P. gingivalis* dan Isolasi Antibodi Protein IgY

Penelitian menggunakan ayam petelur betina jenis *Single Comb Lenghorn* berumur 24 minggu yang siap bertelur. Ayam diimunisasi dengan 0,5 ml suspensi *P.gingivalis* secara subkutan selama tiga hari berturut-turut (Carlender, 2002). Kemudian, pada minggu kedua dan ketiga dilakukan injeksi 1 ml suspensi bakteri *P.gingivalis* dalam *Freund adjuvant complete*. Pada minggu keempat, injeksi dilakukan secara subkutan sebanyak 1 ml suspensi *P.gingivalis* dalam *Freund adjuvant incomplete* (Wibawan *et al*, 2008). Setelah itu telur yang dihasilkan dikumpulkan dan dipisahkan dari telur-telur lain. Telur hasil injeksi pada minggu ke-4 pasca imunisasi pertama adalah telur yang akan dilakukan prosedur ekstraksi igY

Ekstraksi IgY dilakukan dengan memisahkan terlebih dahulu kuning telur dengan bagian putihnya. Kemudian kuning telur diletakkan di atas kertas saring yang telah disiapkan untuk menghilangkan putih telur yang masih melekat. Setelah kuning telur benar-benar terpisah dari putih telur, membran kuning telur

di lubang dengan cara diangkat dengan pinset, kemudian cairan kuning telur ditampung pada *beaker glass* dan dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4. Setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi 5,0 sampai 5,2 kemudian kuning telur disimpan pada suhu 4 °C selama 20 menit. Bagian supernatant dari kuning telur diambil sehingga diperoleh *Water Soluble Fractionation* (WSF) hingga pH menjadi 7.5. Ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6000 dan amonium sulfat. PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi serta mengendapkan IgY (Harris, 2004). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan (Harlow & Lane, 1988). IgY hasil ekstraksi diukur konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop.

4.7.3 Uji Immunogenitas dari Protein IgY

Uji immunogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji SDS-Page untuk melihat keberadaan IgY dan uji dot blot untuk melihat efektivitas IgY terhadap antigen bakteri *P. gingivalis*.

4.7.3.1 Uji SDS-Page

Uji SDS-Page ini digunakan untuk dapat mengetahui keberadaan IgY berdasarkan berat molekulnya. Proses elektroforesis (SDS-PAGE) ekspresi IgY menggunakan metode standar oleh Laemmli (1970).

Tahapan pertama adalah persiapan sampel, sampel yang digunakan adalah antibodi IgY yang telah dihasilkan. Tambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. RSB adalah pereduksi proein. Panaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.

Tahapan selanjutnya adalah tahapan *running gel*. Masukkan 10 µL marker protein ke dalam well/sumuran. Kemudian masukkan sampel ke dalam masing-masing sumuran yang telah tercetak (\pm 15-20 µL/well). Setelah sampel

dimasukkan ke dalam sumurannya masing-masing, kemudian dilakukan *running* dengan arus listrik sebesar 200 volt selama 35 menit (*constant voltage*). Selama *running*, perhatikan pergerakan *marker protein* dan *tracking dye* (berwarna biru). Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari *gel cassette*, proses *running* dapat dihentikan.

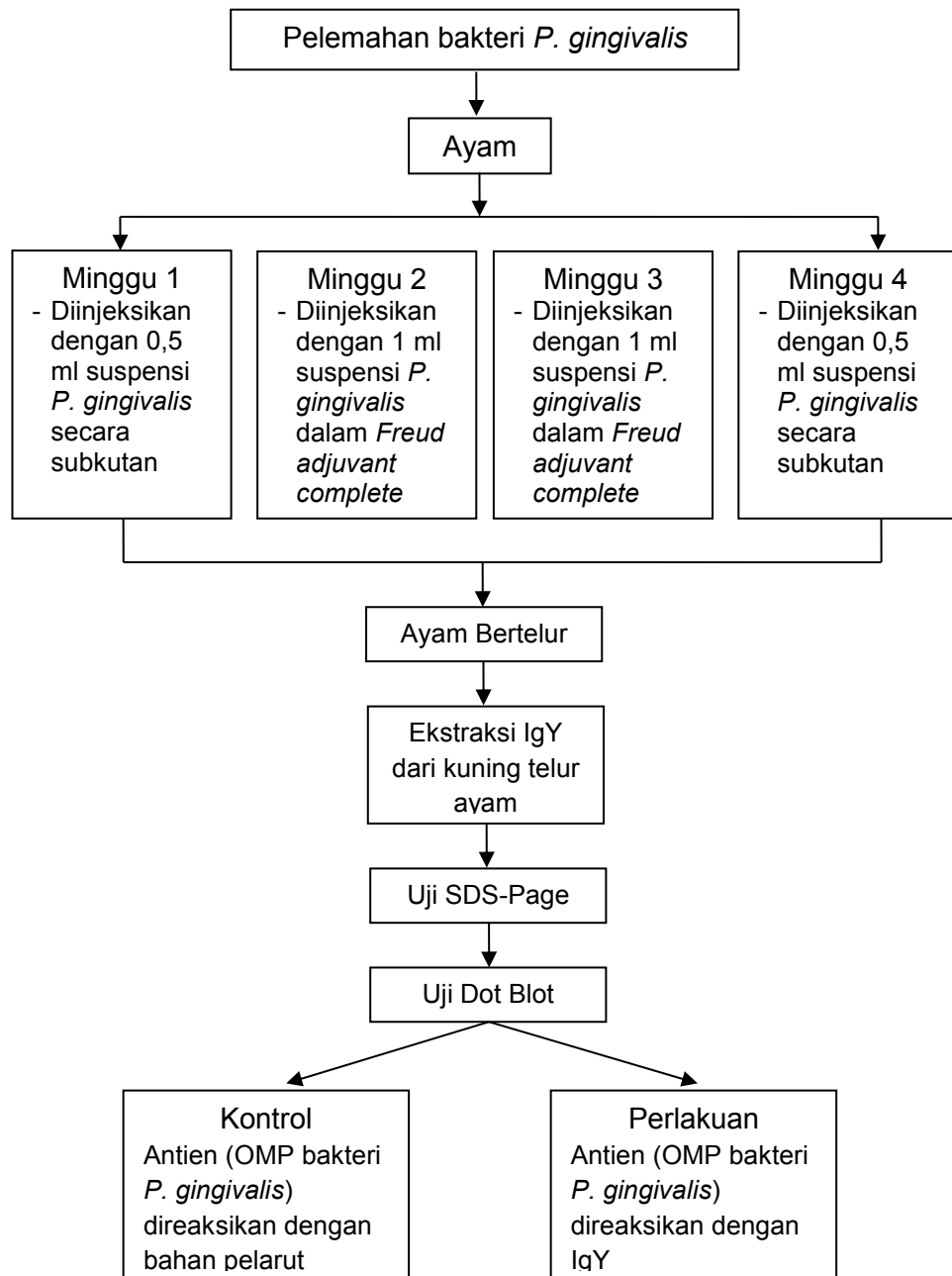
Tahapan terakhir dalam uji SDS-Page adalah *staining gel*. Lepaskan gel dari *gel cassette* secara perlahan kemudian masukkan ke dalam *staining box*. Kemudian tuangkan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Kemudian lakukan inkubasi selama \pm 4-24 jam (*overnight*) dalam *shaker incubator*. Ganti larutan *staining buffer* dengan larutan *de-staining buffer*. Kemudian inkubasi dalam *shaker incubator* hingga pita-pita protein tampak jelas

4.7.3.2 Uji Dot Blot

Dalam uji ini direaksikan antara antigen yaitu OMP *P.gingivalis* dengan antibodi primer yaitu IgY. Uji dilakukan pada 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan yang menggunakan IgY dalam 3 konsentrasi berbeda dan 1 kelompok kontrol yang menggunakan bahan pelarut biasa. Persiapan awal adalah merangkai membran nitroselulosa pada Bio-Dot Apparatus Bio-Rad. Kemudian OMP *P.gingivalis* dilarutkan dalam PBS yang mengandung NaN_3 , kemudian ditetaskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi PBS. Kemudian pada masing-masing sumuran ditetaskan OMP *P.gingivalis* sebanyak 50 μ l. Kemudian digegas agar OMP *P.gingivalis* terserap ke dalam membran, kemudian dibloking dengan bloking buffer (TBS skim milk 5%) selama semalam pada suhu 4 $^{\circ}$ C dan selanjutnya diuci dengan PBS Tween-20 0,05%. Pencucian dilakukan sebanyak 3x3 menit dengan cara digoyang dengan perlahan. Setelah pencucian, dilakukan inkubasi dengan antibodi primer (1:500) selama satu jam dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS Tween-20

0,05%. Pencucian dilakukan sebanyak 2x10 menit dengan cara digoyang perlahan. Hasil yang didapat diinkubasi kembali dengan antibodi sekunder (1:1000) selama 1 jam pada suhu ruang dan dicuci kembali dengan PBS Tween-20 0,05%. Pencucian dilakukan sebanyak 2x10 menit dengan cara digoyang perlahan. Kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat Western Blue selama \pm 20 menit pada ruang gelap sampai berubah warna dan reaksi dihentikan dengan penambahan aquades. Membran dikeluarkan dari alat dot blotter dan dikeringkan pada suhu kamar. Hasil positif apabila terbentuk dot-dot pada membrane nitroselulosa. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian