

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental (*true experimental design*) dengan menggunakan rancangan *randomized post test only control group design*.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan cara acak karena hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dianggap homogen. Tikus diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.

Kriteria inklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut :

- a) Tikus *Rattus norvegicus* wistar jantan
- b) Umur 6-8 minggu
- c) Berat badan 120-160 gram
- d) Kondisi sehat, aktif dan tidak ada kelainan anatomis

Kriteria Eksklusi adalah sebagai berikut :

- a) Tikus *Rattus norvegicus* wistar yang tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian.
- b) Tikus *Rattus norvegicus* wistar yang tidak bergerak aktif atau sakit selama masa perlakuan
- c) Tikus *Rattus norvegicus* wistar yang mati selama masa perlakuan.

#### 4.2.2 Besar Sampel

Perhitungan pengulangan sampel adalah sebagai berikut :

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

p : jumlah perlakuan, n : jumlah pengulangan

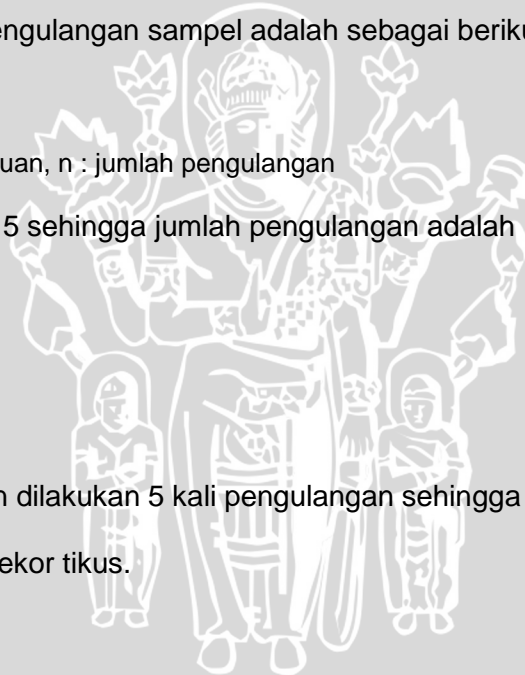
pada penelitian ini p = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah :

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Untuk setiap perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.



Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok	N	Induksi dan Perlakuan
Kontrol Negatif	5	Tidak diinduksi DOCA dan vaksin Perlakuan : diberi minum akuades
Kontrol Positif (DOCA)	5	Diinduksi DOCA tanpa vaksin Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%
Perlakuan I (DOCA + Vaksin)	5	Diinduksi dengan DOCA dan vaksin OMP 100µl/injeksi. Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%
Perlakuan II (DOCA+Vaksin+Ajuvan)	5	Diinduksi dengan DOCA dan diberikan vaksin OMP 100µl/injeksi serta ajuvan CFA/IFA Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%
Perlakuan III (DOCA+Ajuvan)	5	Diinduksi DOCA dan diberi ajuvan CFA/IFA saja Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%



### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah OMP *P. gingivalis* dengan ajuvan (CFA/IFA).

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah proliferasi VSMC.

### 4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

#### 4.4.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam rentang waktu 6 bulan (termasuk penyusunan proposal) terhitung mulai dari akhir Februari hingga awal Juli 2015.

#### 4.4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa Laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya antara lain Laboratorium Farmakologi untuk perawatan tikus, Laboratorium Mikrobiologi untuk kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis*, Laboratorium Biomedik untuk pembuatan vaksin, Laboratorium Patologi Anatomi untuk pengambilan foto sampel histopatologi aorta tikus, Laboratorium Farmasi untuk pengukuran tunika media pada sampel histopatologi aorta tikus dan Laboratorium Fisiologi untuk pengukuran tekanan darah tikus.

### 4.5 Definisi Operasional

- a) Garam *Deoxycorticosterone Acetate* (DOCA) dengan merk TCI. Garam DOCA diberikan dengan dosis 10 mg/kg BB secara subkutan, 2 kali seminggu selama 5 minggu.
- b) Bakteri *P. gingivalis* diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya dan dikultur di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Bakteri

kemudian diambil OMPnya untuk dijadikan bahan vaksin dengan dosis 100 µl/injeksi setiap 10 hari sekali selama 40 hari.

- c) Proliferasi VSMC ditandai dengan peningkatan ketebalan dari tunika media aorta abdominalis tikus. Pengukuran sampel menggunakan mikroskop binokuler, setiap sediaan preparat terdapat 4 sampel yang setiap sampel diukur ketebalannya dari 6 sisi berbeda kemudian dijumlah dan diambil rata-ratanya per sediaan preparat kemudian dijumlah dan dirata-rata lagi sesuai kelompok perlakuan, satuan yang diperoleh adalah µm.
- d) Ajuvan CFA/IFA diperoleh dari Laboratorium Biomedik yang kemudian dicampur dengan perbandingan 1:1 terhadap OMP. Ajuvan CFA diinduksikan saat pemberian vaksin pertama, kemudian IFA diberikan pada injeksi booster.

#### **4.6 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus**

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm beserta tutup kandang dari anyaman kawat, baskom plastik, timbangan, gelas ukur, botol air minum tikus, penimbangan berat badan dengan neraca digital.

##### **4.6.2 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri *P.gingivalis***

Alat dan bahan yang diperlukan adalah *anaerobic jars*, botol, *brucella broth*, *brain heart Infussion broth*, *yeast extract*, hemin, vit.K1.

##### **4.6.3 Alat dan Bahan untuk Isolasi Outer Membran Protein**

Alat dan bahan yang diperlukan adalah sentrifus dingin, vortex, falcon, hasil kultur *P. gingivalis*, asam trikloroasetat dan Phosphate Buffer Saline (PBS)

#### 4.6.4 Alat dan Bahan untuk Elektroforesis SDS-PAGE

Alat dan bahan yang diperlukan adalah alat elektroforesis, shaker, pipet mikro, Acrylamide 30%, Tris HCl 1.5 pH 8.8, aquades steril, SDS 10%, TBS, Temed, sampel, marker profiling dan staining solution.

#### 4.6.5 Alat dan Bahan untuk Vaksinasi

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu omp *P.gingivalis*, PBS, CFA/IFA, pipet mikro, spuit 1 cc, ependorf, vortex, falcon, alkohol 70%, kapas steril dan handscoon.

#### 4.6.6 Alat dan Bahan untuk Penambahan Ajuvan

Alat dan bahan yang diperlukan adalah mikropipet, vortex, eppendorf, Complete Freund's Adjuvant (CFA), Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), PBS, akuades.

#### 4.6.7 Alat dan Bahan untuk Induksi Hipertensi

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu garam DOCA, minyak jagung, spuit 1 cc, handscoon.

#### 4.6.8 Alat dan Bahan untuk Pembedahan

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu sterofoam, gunting bedah, jarum pentul, toples tempat euthanasia, botol sampel, spuit 10cc untuk mengambil darah, vacutainer, handscoon, masker.

### 4.7 Prosedur Kerja Penelitian

#### 4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus

- a) Tikus *Rattus norvegicus* galur wistar dewasa jantan berasal dari Pusvetma Surabaya.
- b) Pada awal penelitian, semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.



- c) Mengadaptasi tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan selama 7 hari di dalam masing-masing kandang dengan pemberian diet normal yaitu pakan standart AIN. Pada masa adaptasi ini, berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan dua kali dalam 1 minggu, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
- d) Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol, dan perlakuan induksi vaksin kemudian DOCA 10mg/kg berat badan dengan setiap kelompok berisi 5 tikus.
- e) Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam sebanyak 2 kali seminggu.
- f) Memberikan minum dengan air setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 80 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
- g) Memberikan pakan setiap hari yang berupa pakan standart AIN yang ditimbang sebanyak 40 gram untuk setiap tikus.
- h) Mengganti air minum tikus yang diberi perlakuan dengan air dicampur NaCl 1% setelah diinduksi DOCA.

#### 4.7.2 Kultur bakteri *P. gingivalis*

- a) Bakteri *P. gingivalis* murni dikultur pada media *Brain Heart Infussion* (BHI) kemudian disterilisasi pada suhu 121° selama 15 menit dan ditambahkan 1 µl/ml vitamin K1 dan 5 µl/ml hemin.
- b) Media yang sudah ditanami bakteri dimasukkan dalam *anaerobic jars* yang mengandung 10% CO<sub>2</sub> serta diinkubasi dalam suhu 37°C selama 2x24 jam.

#### 4.7.3 Isolasi Outer Membrane Protein dari bakteri *P. gingivalis*

- a) Bakteri yang terdapat dalam medium di sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit sehingga didapatkan supernatan dan pelet.
- b) Supernatan yang mengandung medium dibuang, dan pelet yang mengandung bakteri diambil kemudian dilakukan pencucian dengan larutan buffer, *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Bakteri dan PBS dihomogenkan dengan sentrifugasi 6000 rpm sehingga didapatkan supernatan dan pelet.
- c) Supernatan yang mengandung PBS dibuang dan pellet yang mengandung bakteri disimpan dalam suhu  $-40^{\circ}$  untuk kemudian dilakukan isolasi OMP.
- d) Pellet yang mengandung bakteri ditambah dengan PBS dan *n-octyl  $\beta$  D-glucopyranoside* (NOG) 0.05% dengan perbandingan 1:1, dihomogenkan, didiamkan selama 1 menit pada suhu  $4^{\circ}$  kemudian divortex selama 1 menit.
- e) Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan supernatan.
- f) Setelah didapatkan supernatan, sisa pelet dilakukan pengulangan prosedur lagi (prosedur d-e) sebanyak 2 kali sehingga didapatkan 3 sampel OMP yang selanjutnya akan diukur kadar proteinnya menggunakan nanodrop sebelum dilakukan SDS PAGE.

#### 4.7.4 SDS PAGE

- a) Sebagai persiapan SDS PAGE, dilakukan pembuatan *stacking gel* dan *separating gel*.



Tabel 4.2 Stacking dan Separating Gel Buffer

Gel	Presentase Gel	DD H <sub>2</sub> O	Acrylamide/ BIS	Gel Buffer*	10% w/v SDS
<i>Stacking</i>	4%	6.1 ml	1.3 ml	2.5 ml	0.1
<i>Separating</i>	12%	3.4 ml	4.0 ml	2.5 ml	0.1

\*Stacking Gel Buffer : 0.5 M Tris HCl pH 6.8

\*Separating Gel Buffer : 1.5 M Tris HCl pH 8.8

b) Untuk 10 ml *Monomer Solution*

*Separating Gel Buffer* : 50 µl 10% APS (*Ammonium Persulfate*) dan 5 µl TEMED

*Stacking Gel Buffer* : 50 µl 10% APS (*Ammonium Persulfate*) dan 10 µl TEMED

Penambahan APS dan TEMED dilakukan sesaat sebelum larutan dituang ke dalam gel cassette.

c) Volume gel yang dibutuhkan Per Gel

Tabel 4.3 Ketebalan dan Volume Gel

Ketebalan Gel (mm)	Volume (ml)
0.5	2.8
0.75	4.2
1.0	5.6
1.5	8.4

- d) Tuangkan *separating monomer solution* ke dalam *gel cassette*. Diamkan hingga gel mengeras.
- e) Tuangkan *stacking monomer solution* ke dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*. Tambahkan ddH<sub>2</sub>O untuk meng-adjust volume.
- f) Pasang cetakan (comb) ke dalam gel casting, dan masukkan ke dalam chamber.
- g) Siapkan sampel yang akan digunakan. Tambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. Panaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.
- h) Masukkan 10 µl marker protein ke dalam well. Masukkan sampel ke dalam masing-masing well yang telah tercetak (±15-20 µl/well). Running gel selama 35 menit dengan tegangan 200v, *constant voltage*. Perhatikan pergerakan marker protein dan *tracking dye* (berwarna biru).  
Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari gel cassette, proses running dapat dihentikan.
- i) Lepaskan gel dari *gel cassette* secara perlahan. Masukkan ke dalam *staining box*. Tuangkan larutan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Inkubasi selama ± 4 jam-overnight dalam shaker inkubator. Ganti larutan *staining buffer* dengan larutan *de-staining buffer*. Inkubasi dalam shaker inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.

#### 4.7.5 Proses Pembuatan Vaksin

- a) Larutan OMP *P.gingivalis* diencerkan dengan PBS sesuai dengan dosis yang akan diinjeksikan kemudian divortex selama 5 menit. Untuk vaksin yang diberikan tambahan ajuvan, pada minggu pertama OMP ditambah dengan CFA dan minggu selanjutnya diberikan IFA dengan perbandingan 1:1 kemudian di vortex sampai homogen.
- b) Kelompok tikus yang diberi vaksin adalah kelompok tikus perlakuan I (OMP *P.gingivalis*), II (OMP *P.gingivslis* + ajuvan) dan III (ajuvan).
- c) Pemberian vaksin dilakukan dengan injeksi intraperitoneal sebanyak 100µL/injeksi setiap 10 hari sekali selama 40 hari. CFA diberikan pada saat injeksi pertama kali, sedangkan IFA diinjeksikan sebagai booster sebanyak 3 kali setiap 10 hari sekali.

#### 4.7.6 Proses Induksi Hipertensi

- a) Yang diberikan induksi adalah kelompok tikus selain kontrol negatif yang telah diadaptasikan selama 7 hari setelah mendapatkan vaksin.
- b) Memberikan DOCA dengan dosis 10 mg/kg BB sebanyak 0.5 ml secara subkutan, 2 kali seminggu selama 5 minggu. .
- c) Mengganti air minumnya dengan NaCl 1% pada tikus kontrol positif, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III setelah diinduksi oleh garam DOCA untuk menyebabkan retensi natrium dan air sehingga menginduksi tikus menjadi hipertensi.

#### 4.7.7 Pengukuran Tekanan Darah

- a) Pengukuran tekanan darah dilakukan pada kelompok tikus kontrol negatif dan kelompok tikus perlakuan setelah dilakukan induksi vaksin dan DOCA.



- b) Mengukur tekanan darah dengan menggunakan alat Blood Pressure Analyzer merk IITC.

#### 4.7.8 Pengambilan Darah Tikus

- a) Semua tikus dibedah setelah selesai diberi perlakuan dan diukur tekanan darahnya.
- b) Tikus dianastesi terlebih dahulu per inhalasi dengan kloroform diwadah tertutup.
- c) Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
- d) Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ organ dalam rongga abdomen terlihat.
- e) Dilakukan pengambilan darah melalui jantung tikus menggunakan spuit 10cc.
- f) Darah yang diambil dimasukkan ke dalam vacutainer dan diberi label.
- g) Selanjutnya darah diambil serumnya kemudian dibawa ke laboratorium biomedik untuk di cek antibodinya

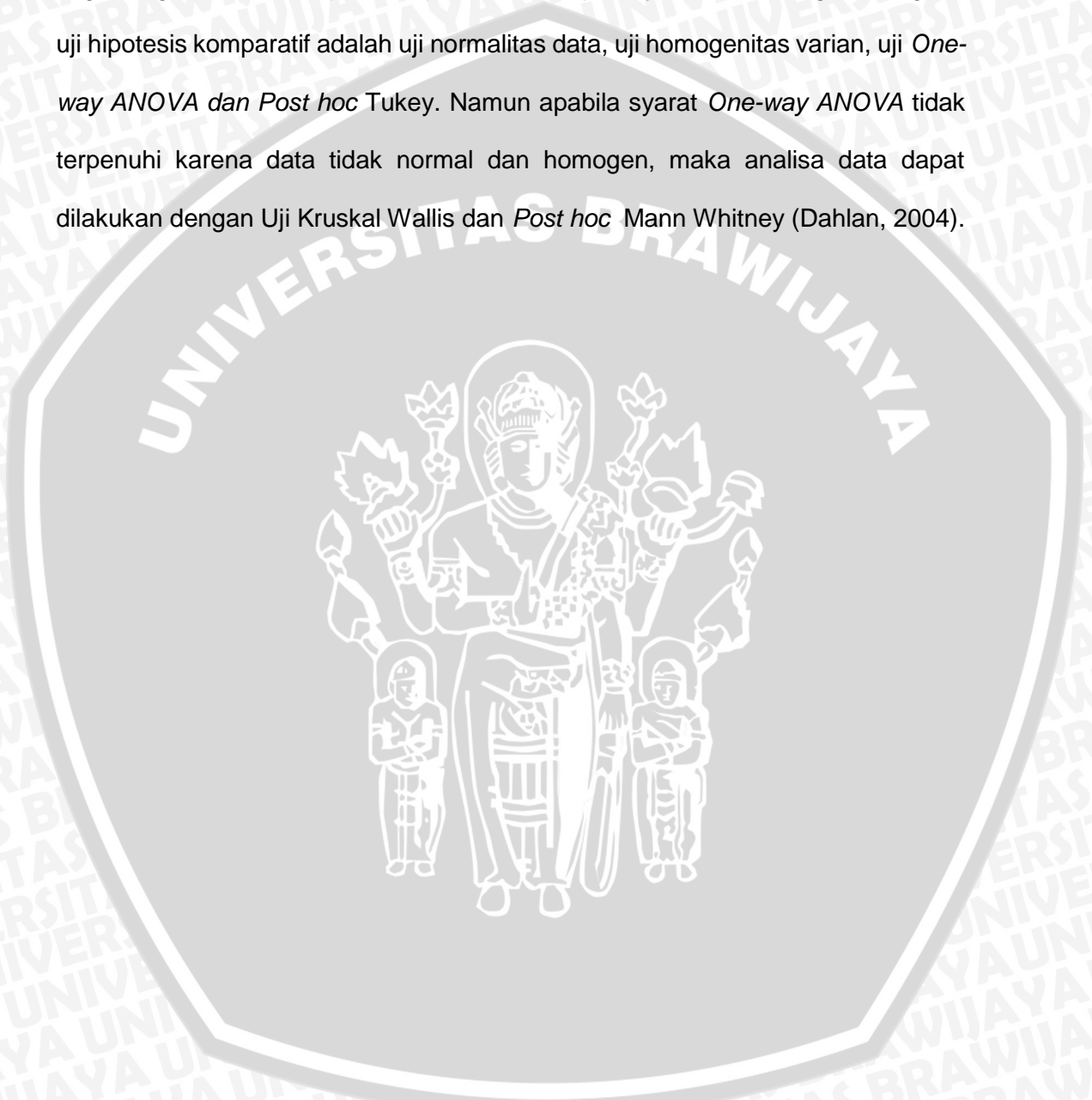
#### 4.7.9 Pengambilan Sampel Histopatologi Aorta Abdominalis Tikus

- a) Setelah pembedahan, aorta tikus didehidrasi dengan formaldehid 10%. Kemudian fiksasi dengan etanol bertingkat 70%, 80%, 90%, dan 95% selama 20 menit.
- b) Proses *clearing* dilakukan dengan cara jaringan dimasukkan xylol I, II dan III secara berturut-turut selama 20 menit.

- c) Tahap selanjutnya adalah *embedding* yaitu paraffin dimasukkan ke dalam cetakan dan potongan jaringan dimasukkan dan cetakan dilabel.
- d) *Sectioning* dilakukan dengan cara jaringan pada blok paraffin dipotong dengan mikrotom setebal 5  $\mu\text{m}$  dan hasil irisan diletakkan pada gelas objek.
- e) Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 38-40°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I, II, dan III selama 5 menit, dilanjutkan dengan proses rehidrasi menggunakan alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% selama 5 menit.
- f) Sediaan kemudian dicuci dengan aquades lalu diwarnai dengan Hematoksilin selama + 10 menit, kemudian dicuci dengan aquadest setelah itu diwarnai dengan Eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan aquadest.
- g) Preparat dikeringkan dan dilakukan *mounting* kemudian ditutup dengan cover glass. Hasilnya kemudian diamati secara visual menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 100x dilanjutkan perbesaran 400x untuk melihat perubahan sel-sel otot polos yang terdapat pada tunika media pada aorta semua kelompok tikus perlakuan.

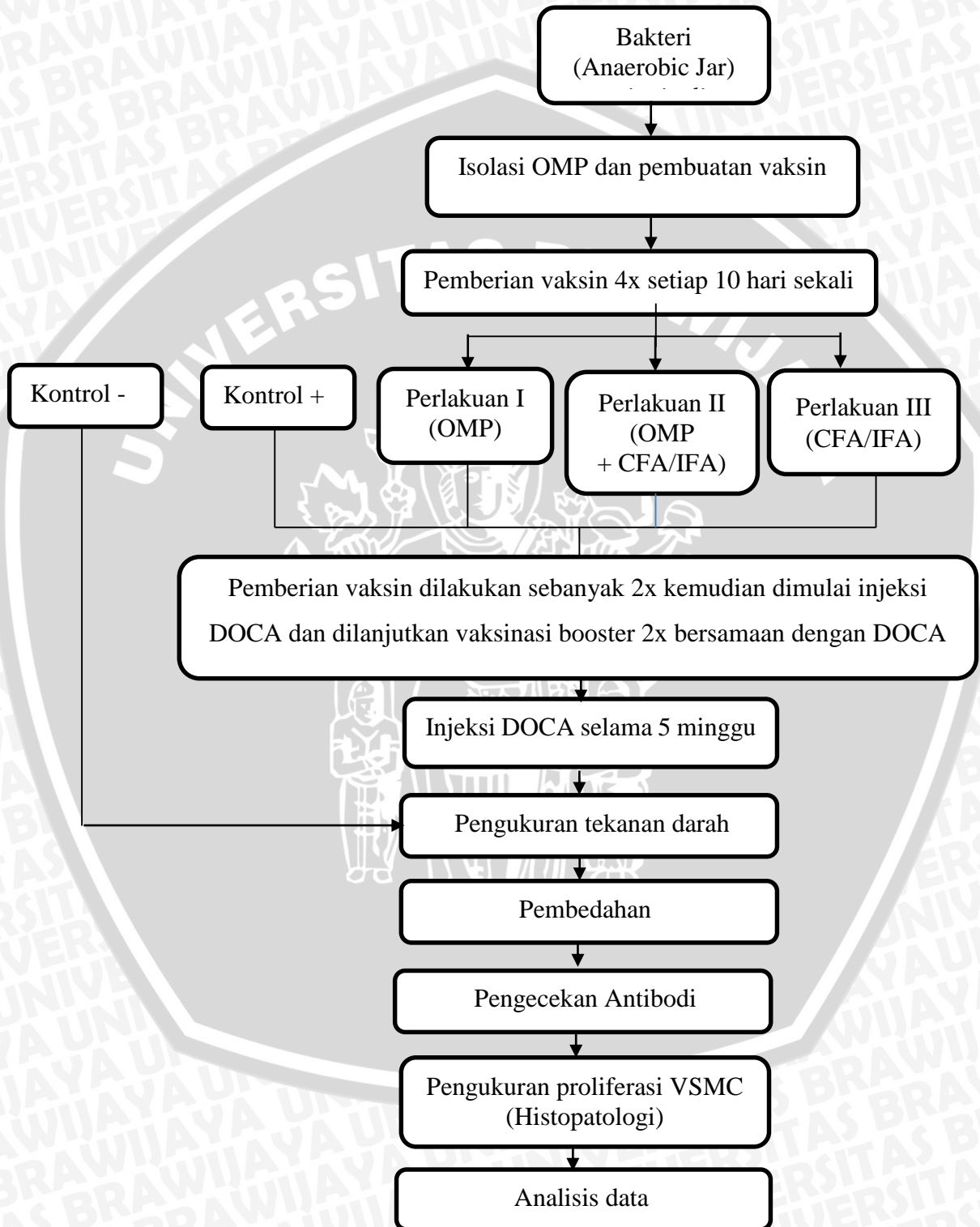
#### 4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik tingkat signifikansi 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ) atau taraf kepercayaan 95%. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc* Tukey. Namun apabila syarat *One-way ANOVA* tidak terpenuhi karena data tidak normal dan homogen, maka analisa data dapat dilakukan dengan Uji Kruskal Wallis dan *Post hoc* Mann Whitney (Dahlan, 2004).





4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian