

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* pada tikus wistar jantan di laboratorium menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar (tikus 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 Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Kriteria inklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut :

- a) Tikus *Rattus norvegicus* wistar jantan
- b) Usia 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.

Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan pengulangan sampel pada setiap kelompok dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut :

$$[p(n-1)] > 16 \text{ (Solimun, 2000)}$$

p : jumlah perlakuan (5 : kelompok KN, KP, P1, P2, P3)

n : jumlah ulangan

$$[5(n-1)] > 16$$

$$[5n - 5] > 16$$

$$5n > 21$$

$$n > 4,2$$

Dengan demikian, jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian adalah minimal 5 ekor tikus setiap kelompok perlakuan dengan 1 tikus sebagai cadangan sehingga total sampel penelitian dibutuhkan 30 ekor tikus.

Kelompok	N	Induksi dan Perlakuan
Kontrol Negatif	5	Tidak diinduksi DOCA dan vaksin Perlakuan : diberi minum air tanpa garam
Kontrol Positif (Garam DOCA)	5	Diinduksi DOCA 10 mg/kgBB tanpa vaksin Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1% (Tikus model hipertensi)
Perlakuan 1 (Garam DOCA+Vaksin OMP)	5	Diinduksi dengan DOCA 10 mg/kgBB dan OMP <i>P. gingivalis</i> 200 ng/injeksi Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%

Perlakuan 2 (Garam DOCA+Vaksin OMP+Alum)	5	Diinduksi dengan DOCA 10 mg/kgBB dan OMP <i>P. gingivalis</i> 200 ng/injeksi+ Alum 0,1 ml/injeksi Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%
Perlakuan 3 (Alum)	5	Diinduksi DOCA 10 mg/kgBB dan Alum 0,1 ml/injeksi Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah OMP bakteri *P. gingivalis* dengan ajuvan (Alum).

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar angiotensin II pada tikus

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Juli tahun 2016 dan dilakukan di beberapa Laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya antara lain Laboratorium Biomedik untuk pembuatan vaksin dan di Laboratorium Ilmu Faal untuk perawatan hewan coba, pemberian perlakuan, dan pengukuran kadar angiotensin II. Penelitian akan dilakukan setelah mendapatkan ijin etik dari Komite Etik FKUB.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba

Alat: Kandang berupa baskom berukuran 30x20 cm dengan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat sebanyak 5 buah, botol minum tikus 15 buah, timbangan analitik, sarung tangan, dan pembersih kandang.

Bahan: Pakan tikus 2 karung, tepung terigu 5 kg, sekam 1 karung, dan air minum untuk tikus.

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Induksi Hipertensi

Alat: spuit 1cc, neraca miligram, dan *handscoon*.

Bahan: NaCl 1%, minyak jagung, garam DOCA (Sigma Aldrich Pte Ltd. Singapore D7000).

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri *P. gingivalis*

Alat: *Anaerobic candle jars*, botol, *agar plate*, *microbact test kit*

Bahan: *Brucella broth*, *tripticase soy agar*, *brain heart Infussion broth*, *yeast extract*, *10% defibrinated horse blood*, hemin 5µg/L, dan vit.K1 0.4 µl/ml.

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Isolasi OMP *P. gingivalis*

Alat: *Vortex*, omnimikser, SDS PAGE, *pili cutter*, mikropipet, sentrifus

Bahan: *Triklor acetite acid* (TCA) 3%, *n-octyl β-D-glucoopyranoside* (NOG) 1%, PBS pH 7.4, dan etanol.

4.5.5 Alat dan Bahan untuk Deteksi Rgp *P.gingivalis* menggunakan SDS PAGE

Alat: Pipet, mikropipet, dan elektroforesis.

Bahan: Supernatan bakteri *P. gingivalis*, *acrylamide* 30%, *SDS* 10%, *APS* 10%, *running buffer*, EPS, TEMED, dan Etanol.

4.5.6. Alat dan Bahan untuk Pembuatan Vaksin

Alat: Spuit 1 cc, *handscoon*, kain lap, *vortex*, *eppendorf*, *falcon*.

Bahan: OMP *P.gingivalis*, Alumunium Hidroksida (Alum), alkohol 70%.

4.5.7 Alat dan Bahan untuk Penambahan Ajuvan

Alat: Mikropipet, pipet, *vortex*, dan *eppendorf*.

Bahan: Alumunium Hidroksida (Alum), PBS, dan akuades.

4.5.8 Alat dan Bahan untuk Penyuntikan Vaksin dan Ajuvan

Alat: Spuit 1 cc, *handscoon*, kain lap, *vortex*, dan *eppendorf*.

Bahan: Vaksin untuk masing–masing kelompok perlakuan dan alkohol 70%.

4.5.9 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Tekanan Darah

Alat : *Blood Pressure Analyzer*, *handscoon*, *tissue*, penjepit ekor tikus.

4.5.10 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Alat : Gunting bedah 2, pinset, jarum pentul, steroform , penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik dan tutup 30 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, dan vakutainer 30 buah.

Bahan: Kloroform 20 ml, formalin 10 % 200 ml, alkohol, dan es.

4.5.11 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Kadar Angiotensin II

Alat: ELISA *reader*, *microplate*, dan sumuran.

Bahan: Antibodi biotin, dan *buffer*.

4.6 Definisi Operasional

1. Model tikus hipertensi dibuat dengan cara induksi DOCA-*salt* (DOCA + konsumsi tinggi garam) dengan dosis DOCA 10 mg/kgBB yang diberikan dua minggu sekali secara subkutan sebagai penginduksi hipertensi selama 6 minggu (Badyal, *et al.*, 2003; Athiroh dan Permatasari, 2011).

2. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dibeli dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. OMP *P. gingivalis* adalah bagian dari dinding sel *P. gingivalis* yang diisolasi menggunakan deterjen *n-octyl β-D-glucopyranoside* (NOG) dan proses dialisa. OMP *P. gingivalis* diberikan dengan dosis 200 ng yang diencerkan dengan PBS menjadi 100 µl atau setara dengan 0,1 ml dan diinjeksikan secara intraperitoneal setiap 10 hari sekali selama 40 hari.
3. Alumunium hidroksida (Alum) adalah ajuvan yang biasa digunakan untuk vaksinasi (Wigren *et al.*, 2009). Alum dibeli dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 100 µl atau setara dengan 0,1 ml.
4. Pengukuran tekanan darah tikus dilakukan dengan menggunakan alat *Blood Pressure Analyzer* merk IITC yang diletakkan pada ujung proksimal ekor tikus dengan 5 kali pengulangan kemudian dirata-rata.
5. Kadar angiotensin II diukur dengan metode ELISA menggunakan standar angiotensin II.

4.7 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data

4.7.1 Perawatan Hewan Coba

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

- c) Pada kandang tikus diberi label sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol, dan perlakuan induksi vaksin kemudian DOCA 10mg/kg berat badan dengan setiap kelompok berisi 6 tikus.
- d) Pada kandang diberi alas berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan pergantian sekam dilakukan sebanyak 1 kali seminggu.
- e) Minum dengan air diberikan 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.
- f) Pakan diberikan setiap hari yang berupa pakan standart AIN yang ditimbang sebanyak 40 gram untuk setiap tikus.
- g) Air minum tikus yang diberi perlakuan diganti dengan air dicampur NaCl 1% setelah diinduksi DOCA.

4.7.2 Induksi Hipertensi

- a) Induksi hipertensi dilakukan pada kelompok tikus selain kontrol negatif yang telah diadaptasikan selama 7 hari setelah mendapatkan vaksin.
- b) DOCA dengan dosis 10 mg/kg BB diberikan sebanyak 0.5 ml secara subkutan, 2 kali seminggu selama 6 minggu. .
- c) Air minum tikus diganti dengan NaCl 1% pada tikus kontrol positif, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III setelah diinduksi oleh DOCA untuk menyebabkan retensi natrium dan air sehingga menginduksi tikus menjadi hipertensi.

4.7.3 Kultur Bakteri *P. gingivalis*

- a) Dilakukan kultur bakteri *P. gingivalis* murni pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan ditambahkan 1 µl/ml vitamin K1 dan 5 µl/ml hemin.
- b) Media yang sudah ditanami bakteri dimasukkan ke dalam *anaerobic jars* yang mengandung 10% CO₂ serta diinkubasi dalam suhu 37°C selama 2x24 jam.

4.7.4 Isolasi OMP dari Bakteri *P. gingivalis*

- a) Dilakukan sentrifugasi bakteri yang terdapat dalam medium 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).
- c) Bakteri dan PBS dihomogenkan dengan sentrifugasi 6000 rpm sehingga didapatkan supernatan dan pelet.
- d) Supernatan yang mengandung PBS dan pelet yang mengandung bakteri dibuang.
- e) Dilakukan penyimpanan dalam suhu -40°C untuk kemudian dilakukan isolasi OMP.
- f) PBS dan *n-octyl β D-glucoopyranoside* (NOG) 0.05% ditambahkan pada pellet yang mengandung bakteri dengan perbandingan 1:1, dihomogenkan dan didiamkan selama 1 menit pada suhu 4°C
- g) Dilakukan vortex selama 1 menit.

- h) Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan supernatan.
- i) Setelah didapatkan supernatan, sisa pelet dilakukan pengulangan prosedur lagi (prosedur d-e) sebanyak 2 kali sehingga didapatkan 3 sampel OMP.
- j) Pengukuran kadar protein menggunakan nanodrop sebelum dilakukan SDS PAGE.

4.7.5 Profiling OMP bakteri *P. gingivalis* (SDS PAGE)

- a) Sebagai persiapan SDS PAGE, dilakukan pembuatan *stacking gel* dan *separating gel*.
- b) *Separating monomer solution* dituang ke dalam *gel cassette*. Diamkan hingga gel mengeras.
- c) *Stacking monomer solution* dituang ke dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*.
- d) Menambah ddH₂O untuk meng-*adjust* volume.
- e) Cetakan (*comb*) dipasang ke dalam *gel casting*, dan dimasukkan ke dalam *chamber*.
- f) Sampel yang akan digunakan disiapkan.
- g) RSB (*Reducing Sample Buffer*) ditambahkan ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1.
- h) Dilakukan pemanasan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.
- i) 10 µl marker protein dimasukkan ke dalam *well*.
- j) Sampel dimasukkan ke dalam masing-masing *well* yang telah tercetak ($\pm 15-20$ µl/*well*).

- k) *Running gel* selama 35 menit dengan tegangan 200v, *constant voltage*.
- l) Dilakukan pengamatan pada pergerakan marker protein dan *tracking dye* (berwarna biru). Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari *gel cassette*, proses *running* dapat dihentikan.
- m) Gel dari *gel cassette* dilepaskan secara perlahan. Dimasukkan ke dalam *staining box*.
- n) Larutan *staining buffer* dituang hingga gel terendam sempurna.
- o) Dilakukan inkubasi selama ± 4 jam-*overnight* dalam *shaker* inkubator.
- p) Larutan *staining buffer* diganti dengan larutan *de-staining buffer*.
- q) Dilakukan inkubasi dalam *shaker* inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.

4.7.6 Pembuatan vaksin

- a) Dilakukan pengenceran larutan OMP *P.gingivalis* 200 ng dengan PBS menjadi 100 μ l atau setara dengan 0,1 ml sesuai dengan dosis yang akan diinjeksikan.
- b) Kemudian divortex selama 5 menit. Untuk vaksin yang diberikan tambahan Alum, pada minggu pertama OMP ditambah dengan Alum sebanyak 0,1 ml dengan perbandingan 1:1 kemudian divortex sampai homogen.
- c) Kelompok tikus yang diberi vaksin adalah kelompok tikus perlakuan I (OMP *P.gingivalis*), II (OMP *P.gingivslis* + Alum) dan III (Alum).
- d) Pemberian vaksin dilakukan dengan injeksi intraperitoneal sebanyak 100 μ L/injeksi setiap 10 hari sekali selama 40 hari. Alum sudah diberikan pada saat injeksi pertama kali.

4.7.7 Penambahan ajuvan

- a) Alum dengan OMP *P.gingivalis* dicampur ke dalam *falcon* dengan perbandingan 1:1.
- b) Dilakukan pencampuran hingga rata dengan menggunakan *vortex* selama 2 jam.
- c) Kesolidan suspensi diuji dengan meneteskan campuran OMP dan alum pada larutan akuades.

4.7.8 Pengukuran Tekanan Darah Tikus

- a) Pengukuran tekanan darah dilakukan pada kelompok tikus kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok tikus perlakuan setelah dilakukan induksi vaksin dan DOCA-*salt*.
- b) Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat *Blood Pressure Analyzer* merk IITC.

4.7.9 Pembedahan Tikus

- a) Semua tikus dibedah setelah selesai diberi perlakuan dan diukur tekanan darahnya.
- b) Tikus dianestesi terlebih dahulu per inhalasi dengan kloroform di wadah tertutup.
- c) Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam.
- d) Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
- e) Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median.
- f) Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ-organ dalam rongga abdomen terlihat.

- g) Dilakukan pengambilan darah melalui jantung tikus menggunakan spuit 3cc.
- h) Darah yang diambil dimasukkan ke dalam vacutainer dan diberi label.
- i) Dilakukan pengambilan serum darah.
- j) Kemudian dibawa ke laboratorium ilmu faal untuk dicek kadar angiotensin II.

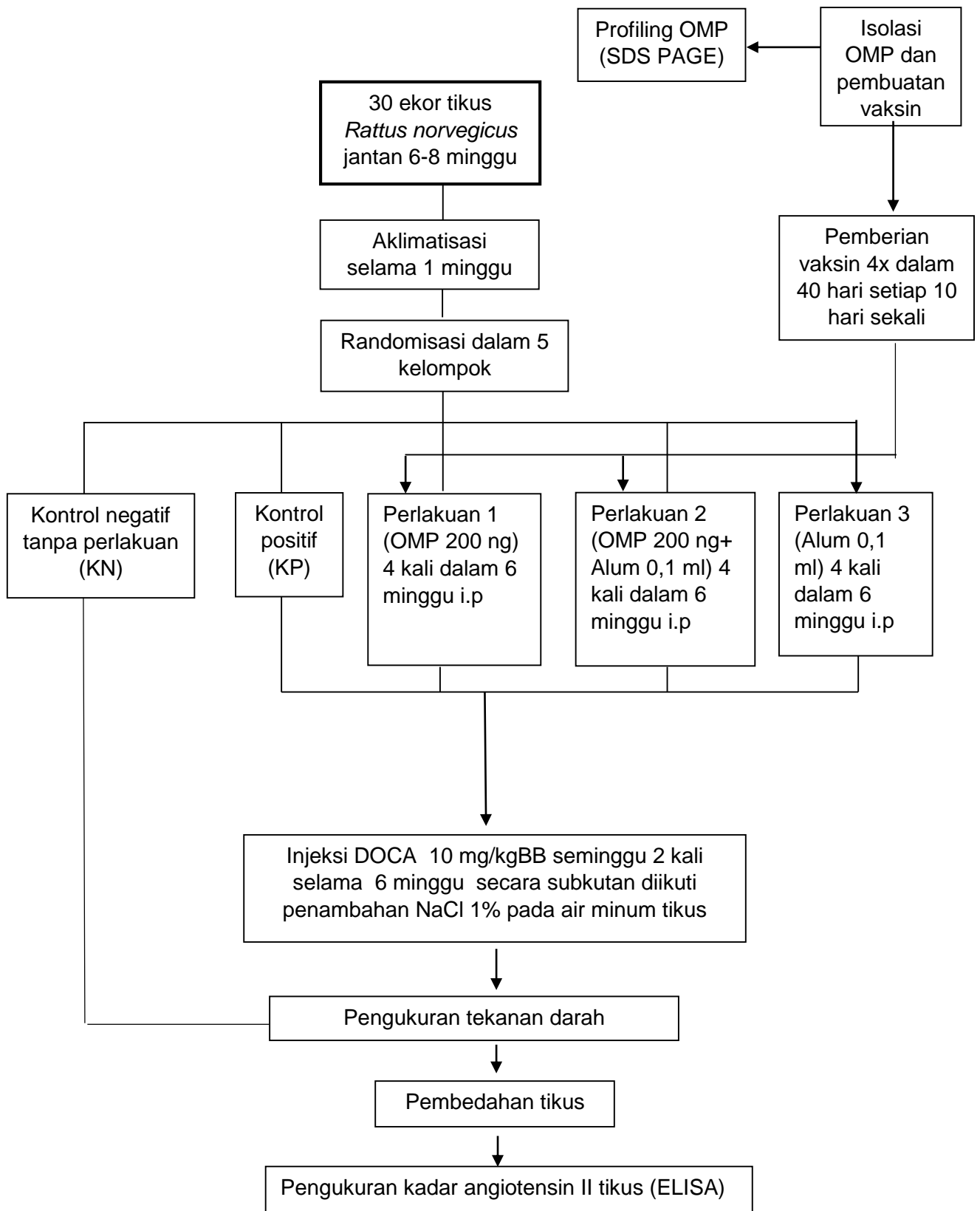
4.7.10 Pengukuran Kadar Angiotensin II (ELISA)

- a) Semua reagen, sampel dan standard disiapkan sesuai dengan prosedur.
- b) Dilakukan penambahan 100 μ l anti-Angiotensin II dengan label *biotin* ke dalam tiap sumuran.
- c) Diinkubasi 1,5 jam pada suhu ruangan. Cuci mikroplate 4 kali dengan *buffer*.
- d) Dilakukan penambahan 100 μ l sampel pada tiap sumuran.
- e) Diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu ruangan. Mencuci mikroplate 4x dengan *buffer*.
- f) Dilakukan penambahan 100 μ l larutan *Streptavidin*.
- g) Diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruangan. Mencuci mikroplate 4x dengan *buffer*.
- h) Dilakukan penambahan 100 μ l *TMB One-Step Substrate* pada tiap sumuran.
- i) Diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan.
- j) Dilakukan penambahan 50 μ l *Stop Solution* pada tiap sumuran.
- k) Kemudian segera dilakukan pembacaan dengan ELISA *reader* pada $\lambda=405$ nm.

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan validitas 95% ($\alpha = 0,05$). Analisis data yang digunakan adalah analisis uji normalitas untuk menentukan data yang telah terkumpul terdistribusi normal atau tidak, uji homogenitas untuk mengetahui variansi data dalam variabel bersifat homogen atau tidak, *One-way ANOVA* untuk menguji perbedaan rata-rata data lebih dari dua kelompok apakah bermakna atau tidak, dan uji *Post hoc Tukey HSD* jika H_0 ditolak (ada perbedaan) untuk melihat kelompok mana saja yang berbeda.

4.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian