

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit Balb/C sebagai subjek penelitian yang sebelumnya diinjeksikan pristane untuk induksi LES dan kemudian diinjeksikan *self antigen dsDNA* dalam berbagai dosis secara berurutan dan bertahap.

4.2 Populasi dan Jumlah

Sampel penelitian ini adalah mencit strain Balb/c yang diperoleh dari LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah bersertifikasi. Mencit diinjeksikan vaksin *self antigen dsDNA* lalu dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai variabel. Penelitian akan dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Tabel 4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi Mencit Penelitian

Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi
Mencit strain Balb/c betina	Mencit yang selama penelitian tidak mau makan dan bulu rontok
Mencit sehat dan bergerak aktif	Mencit tidak aktif bergerak
Umur 6-8 minggu	
Berat badan rata-rata 25-30 gram	

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah dua perlakuan yaitu injeksi *pristane* 0.5 intraperitoneal dan injeksi *self antigen* dsDNA secara bertahap. Namun hewan coba dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan waktu analisis dan lamanya paparan. Pembahagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2.2 Pembahagian Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	Tidak diberikan perlakuan apapun
Kontrol Positif	Induksi <i>pristane</i> tanpa pemberian <i>self antigen</i> dsDNA dan dianalisis pada minggu ke-11
Perlakuan A	Induksi <i>pristane</i> dan pemberian <i>self antigen</i> dsDNA konsentrasi I dan dianalisis pada minggu ke-11
Perlakuan B	Induksi <i>pristane</i> dan <i>self antigen</i> dsDNA konsentrasi II dan dianalisis pada minggu ke-11
Kelompok D	Induksi <i>pristane</i> dan <i>self antigen</i> dsDNA konsentrasi III dan dianalisis pada minggu ke-11

Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut (Supranto, 2000):

$$(t-1)(r-1) > 15$$

t : jumlah perlakuan

r : jumlah sampel

Penelitian ini terdapat lima perlakuan sebagaimana yang telah disebutkan sebelumnya. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

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

$$4 (t-1) > 15$$

$$t-1 > 3.75$$

$$t > 4.75$$

$n \geq 4.75$ dibulatkan keatas menjadi 5

Untuk lima perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak lima kali. Namun untuk mencegah adanya kehilangan data akibat mati setelah perlakuan maka setiap kelompok mencit ditambahkan dua sampel sehingga masing-masing kelompok didapatkan tujuh mencit, sehingga total mencit yang dipakai menjadi 35 ekor mencit Balb/c. Penambahan jumlah sampel tersebut untuk memenuhi data minimal.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *self antigen* dsDNA dalam berbagai dosis.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar TGF- β pada darah hewan coba model lupus eritematosus sistemik.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Pelakuan *Flow cytometry* dan *in vivo-jetPEI* dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB
2. Isolasi DNA di Laboratorium Parasitologi FKUB
3. Pemeliharaan dan pembedahan mencit dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB
4. Pengukuran kadar TGF- β dalam jaringan menggunakan ELISA di Laboratorium Kawi 31, Jalan Kawi, Malang

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 4 bulan dengan rincian :

1. Adaptasi mencit di minggu pertama
2. Injeksi pristane pada mencit di minggu ke-2 pada mencit kontrol positif dan perlakuan A, B dan C
3. Isolasi DNA di minggu ke-3 pada mencit yang normal.
4. Melakukan *in vivo-jetPEI* dan injeksi *self antigen dsDNA* pada mencit di minggu ke-14,15 serta 16
5. Pembedahan dan pengerjaan ELISA pada minggu ke-17

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Mencit Lupus

Hewan coba model LES adalah mencit Balb/C betina, yang telah menunjukkan tanda lupus karena induksi pristane. Diukur dari laboratorium dengan hasil ukur kadar ANA dengan skala U.

4.5.2 Injeksi Pristane

Pristane adalah senyawa suatu alkana isoprenoid yang ditemukan tinggi konsentrasinya dalam minyak mineral, merupakan salah satu metode pengembangan murine dari LES. Pristane didapatkan dengan sediaan langsung berbentuk larutan 100 ml/cc dalam botol.

4.5.3 Pemberian *Self Antigen* dsDNA

Self antigen dsDNA merupakan antigen yang digunakan dengan metode *Elicit Dose* dengan optimasi pada penentuan dosis . Antigen ini diisolasi dari darah mencit yang telah diinduksi lupus dalam μL .

4.5.4 Kadar TGF- β

kadar TGF- β adalah sitokin yang dihasilkan oleh pelbagai sel seperti sel Treg kadarnya diukur dalam limfa menggunakan metode ELISA diukur dalam pg/ml.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk melakukan pembedahan mencit:

1. Gunting bedah
2. Pinset
3. Jarum pentul
4. Sterofoam atau papan fiksasi
5. Kapas

Bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit:

1. Chlorofoam atau eter
2. Formalin 10%

3. Alcohol
4. Vacutainer
5. Spuit 5cc

Alat dan Bahan untuk mengukur variabel

1. Induksi mencit Balb/c model LES: Pristane (Sigma Aldrich no. Catalog p2870-100ML) 0.5ml
2. Alat yang digunakan untuk ELISA: ELISA Reader dan Pippet aid.
3. Bahan yang digunakan untuk ELISA: TGF- β ELISA KIT
4. Bahan yang digunakan untuk Isolasi DNA : NucleoSpin Tissue 50prep (Macherey Nagel-Germany), NucleoSpin Blood 50prep (Macherey Nagel-Germany) nano drop, in vivo-jetPEI 0.5ml (Polypus/201-50)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/C yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit Balb/C diperoleh dari LPPT UGM Yogyakarta karena telah memiliki sertifikasi mengenai keaslian strain. Mencit Balb/C dipilih karena penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/C dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Mencit diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang. Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pemberian Pristane

Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu mencit yang diinjeksikan pristane dan mencit yang tidak diinjeksikan pristane sebagai kontrol.

Sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, pristane diinjeksikan sebanyak 0.5 ml di abdomen. Injeksi hanya dilakukan satu kali. Prosedur injeksi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mencit kontrol positif disiapkan terlebih dahulu dan dipisahkan dari kelompok kontrol negatif.
2. Pristane dipersiapkan dan diambil menggunakan spuit insulin 1cc sebanyak 0.5 ml.
3. Mencit diambil dan diposisikan terlentang untuk melakukan injeksi
4. Injeksi dilakukan secara intraperitoneal pada daerah inguinal mencit yang disuntikkan secara sejajar dengan tubuh mencit.

4.7.3 Persiapan Pembuatan Self Antigen dsDNA

Sebelum memulai prosedur, dipastikan Buffer B5 dan Proteinase K telah tersedia, set inkubasi telah diatur pada suhu 70oC serta dipanaskan ulang Elution Buffer pada suhu 70°C. Sampel ds-DNA diisolasi dari serum darah mencit yang sehat.

1. Lisis sampel darah

Pipette 25µL Proteinase K dan tambahkan 200µL sampel darah. Tambahkan 200µL Buffer B3 pada sampel dan vortex selama 10 hingga 20 detik. Setelah itu, inkubasi sampel pada suhu 70oC selama 10 hingga 15 menit.

2. Pengaturan kondisi pengikatan DNA

Tambahkan 210 μ L ethanol (96 hingga 100%) kepada sampel dan vortex lagi.

3. Pengikatan DNA

Untuk tiap preparasi, ambil satu Nucleospin® Blood Column dan letak di Collection tube serta pindahkan sampel. Sentrifugasi sampel selama satu menit pada 11,000 x g. Jika sampel tidak terpisah, sentrifugasi diulang pada G-force yang lebih tinggi (< 15,000 x g). Setelah itu, ambil Collection Tube

4. Cuci membrane silica

Cucian pertama: Taruh Nucleospin® Blood Column pada Collecton Tube yang baru (2mL) dan tambahkan 500 μ L Buffer BW. Sentrifugasi selama 1 menit pada 11,000 x g. Setelah itu, ambil Collection Tube.

Cucian kedua: Taruh Nucleospin® Blood Column pada Collecton Tube yang baru (2mL) dan tambahkan 600 μ L Buffer B5.

Sentrifugasi selama 1 menit pada 11,000 x g. Setelah itu, ambil Collection Tube.

5. Keringkan membrane silica

Taruh kembali Nucleospin® Blood Column pada Collecton Tube dan sentrifugasi selama 1 menit pada 11,000 x g.

6. Elute DNA murni

Taruh Nucleospin® Blood Column pada microcentrifuge tube (1.5mL) dan tambahkan 100 μ L Buffer BE yang telah dipanaskan pada suhu 70°C. Setelah itu, diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan disentrifugasi selama 1 menit pada 11,000 x g.

(Genomic DNA from blood: User manual, 2016)

4.7.4 Preparasi dan Injeksi dsDNA

Dengan menggunakan in vivo-jetPEI (Polypus/201-5), prosedur pelaksanaannya seperti berikut:

1. Encerkan dsDNA dengan menggunakan cairan glukosa 10% dan air steril. Vortex perlahan dan lakukan spin down menggunakan pipet.
2. Encerkan reagent in vivo-jetPEI menggunakan cairan glukosa 10% dan air steril. Vortex perlahan dan lakukan spin down menggunakan pipet.
3. Tambahkan sampel cairan in vivo jetPEI kepada sampel asam nukleat. Vortex perlahan dan lakukan spin down menggunakan pipet.
4. Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu kamar. Pada saat ini, sampel stabil selama 2 jam jika disimpan pada suhu kamar, dan 24 jam jika disimpan pada suhu 4°C.
5. Lakukan injeksi pada mencit secara intramuskuler dengan dosis tertentu yang bertahap selang 1 minggu selama 3 kali.
6. Monitor untuk menentukan dosis konsentrasi dosis yang akan diinjeksi kepada mencit telah dihitung menggunakan N/P ratio dengan menggunakan formula:

$\mu\text{L DNA} \times 3$

100

(in vivo jetPEI: DNA & siRNA Delivery Protocol, 2009)

4.7.5 Pengukuran Kadar TGF- β

Sitokin TGF- β diukur menggunakan metode ELISA. kadar TGF- β menginduksi diferensiasi sel Treg dan supresi sel Th1 dan Th2. TGF- β yang diproduksi oleh kultur sel T-reg ada dalam medium kultur (supernatan) dan dianalisa dengan ELISA-kit (Saini et al, 2014). Analisa ini dilakukan sesuai prosedur yang diberikan oleh pabrik pembuat ELISA kit yang akan digunakan (eBioscience). Data yang didapat berupa kadar TGF- β dalam supernatan.

1. Coat Corning Costar 9018 (atau Nunc Maxisorp TM) Pelat ELISA dengan 100 μ L / baik antibodi penangkap pada Coating Buffer 1X (encerkan sebagai dicatat pada C dari A, yang disertakan dengan pereaksi reagen). Tutup piring dan inkubasi semalaman pada suhu 2-8 ° C.

2. Sumur aspirasi dan cuci 3 kali dengan > 250 μ L / Sumur Cuci Buffer *. Membiarkan waktu untuk merendam (~ 1 menit) pada setiap langkah mencuci untuk meningkatkan efektivitas pencucian. Blot plate pada kertas penyerap untuk menghilangkan sisa penyangga.

3. Larutkan 1 bagian 5X ELISA / ELISPOT Diencerkan dengan 4 bagian air DI. * Blokir sumur dengan 200 μ L / sumur Pengencer ELISA / ELISPOT 1X. Inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam.

4. Opsional: Aspirasi dan cuci minimal satu kali dengan Wash Buffer

5. Aktivasi Asam Sampel: Untuk mengaktifkan TGF β 1 laten ke bentuk imunoreaktif, sampel (tapi bukan standar) harus diasamkan, dan kemudian dinetralisir. Serum hewan yang digunakan dalam media kultur mungkin mengandung TGF β 1 laten tingkat tinggi, jadi kontrol seharusnya dilakukan lari untuk menentukan konsentrasi dasar TGF β 1 pada media kultur.

- Supernatan kultur jaringan: Per 100 ul sampel, tambahkan 20 ul HCN 1N; Inkubasi 10 menit pada suhu kamar menetralkan dengan 20 ul NaOH 1N. [Saat menghitung konsentrasi sampel akhir, sesuai dengan faktor pengenceran 1,4.]

- Serum atau plasma: Encerkan 1: 5 di PBS *, lalu obati seperti di atas untuk supernatan

6. Menggunakan pelarut 1X ELISA / ELISPOT, mengencerkan standar seperti yang tercantum pada Certificate of Analysis (C dari A). Tambahkan 100 µl / baik standar ke sumur yang sesuai Lakukan pengenceran serial 2 kali lipat dari standar atas untuk membuat kurva standar. Tambahkan 100 µl / sumur dari sampel anda ke sumur yang sesuai, menipiskannya paling sedikit 2 kali lipat dalam 1X ELISA / ELISPOT Diluent *. Tutup atau tutup piring dan inkubasi pada suhu kamar selama 2 jam (atau semalam pada 2-8 ° C untuk sensitivitas maksimal).

7. Aspirasi / cuci seperti pada langkah 2. Ulangi untuk total 3-5 kali mencuci **.

8. Tambahkan 100 µL / baik antibodi deteksi yang dilarutkan dalam 1X ELISA / ELISPOT Diluent * (encerkan seperti yang dicatat pada C dari A). Tutup piring dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam.

9. Aspirasi / cuci seperti pada langkah 2. Ulangi untuk total 3-5 kali mencuci **.

10. Tambahkan 100 µL / baik Avidin-HRP * diencerkan dalam 1X ELISA / ELISPOT Diluent (encerkan seperti yang dicatat pada C dari A). Seal piring dan inkubasi di

suhu kamar selama 30 menit.

11. Aspirasi dan cuci seperti pada langkah 2. Pada langkah mencuci ini, rendam sumur di Wash Buffer * selama 1 sampai 2 menit sebelum aspirasi. Ulangi totalnya dari 5-7 mencuci **.

12. Tambahkan 100 μL / sumur larutan 1X TMB ke masing-masing sumur. Piring inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit.

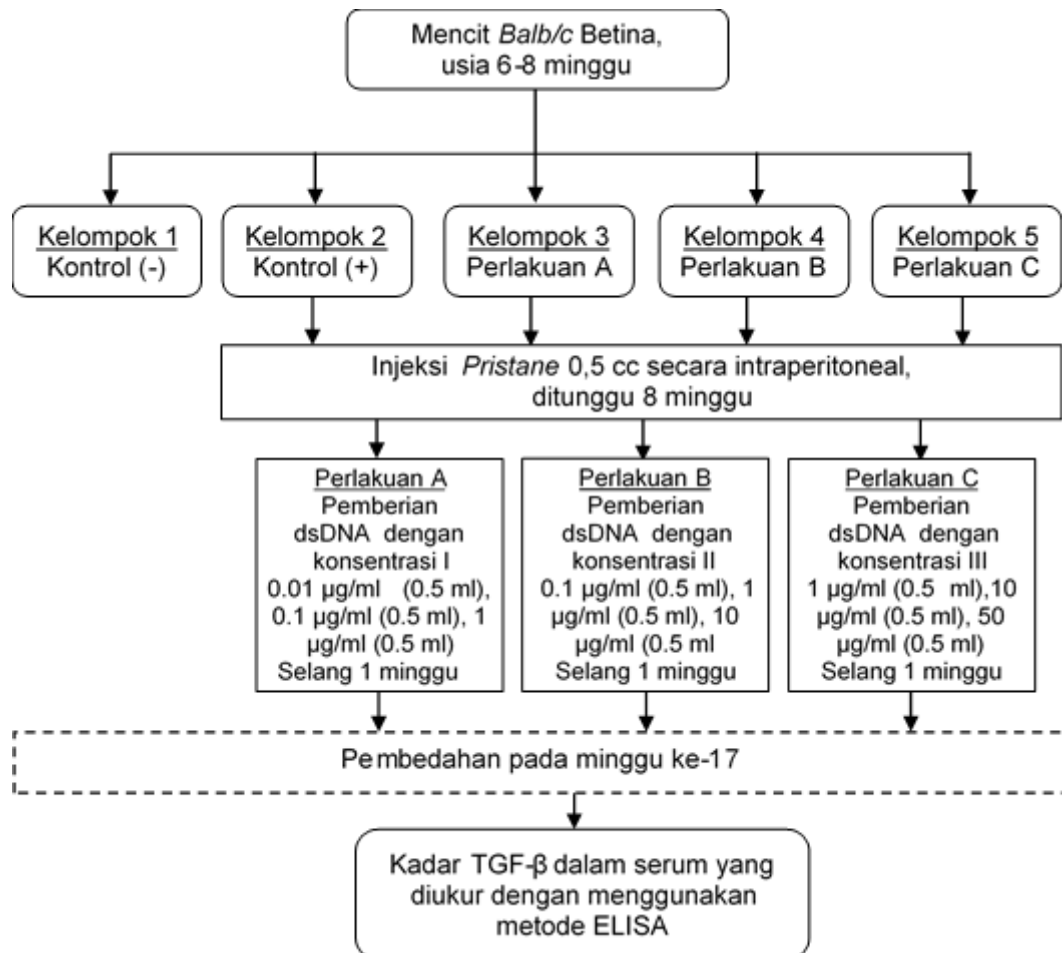
13. Tambahkan 50 μL Stop Solution ke masing-masing sumur.

14. Baca piring di 450 nm. Jika pengurangan panjang gelombang tersedia, kurangi nilai 570 nm dari yang ada 450 nm dan analisis data.

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran parameter mencit kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann-Whitney U*.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.9 Alur Penelitian