

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) dilaboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Objek dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diberikan diet atherogenik yang kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut:

$$p(n-1) > 15$$

p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$n-1 > 15:5, n > 4$$

jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 5

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin DM tipe 2 dengan menggunakan berbagai bahan yaitu KLH-CFA/IFA, p85-KLH dan p85-KLH-CFA/IFA yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus wistar yang tidak diinduksi DM tipe 2 dan tanpa diberikan vaksinasi)

2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diinduksi DM tipe 2 tanpa diberikan vaksinasi)
3. Kelompok 3: Perlakuan 1, tikus yang diinduksi DM tipe 2 dengan diberikan vaksinasi p85-KLH CFA/IFA 100 μ l/ injeksi
4. Kelompok 4: Perlakuan 2, tikus yang diinduksi DM tipe 2 dengan diberikan vaksinasi p85-KLH 100 μ l/ injeksi
5. Kelompok 5: Perlakuan 3, tikus yang diinduksi DM tipe 2 dengan diberikan vaksinasi KLH CFA/IFA 100 μ l/ injeksi

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: (a) spesifisitas dan kadar antibodi terhadap p85, (c) kadar glukosa darah tikus (d) kadar P85 pada sel otot skelet dan hepar.

4.4 Definisi Operasional

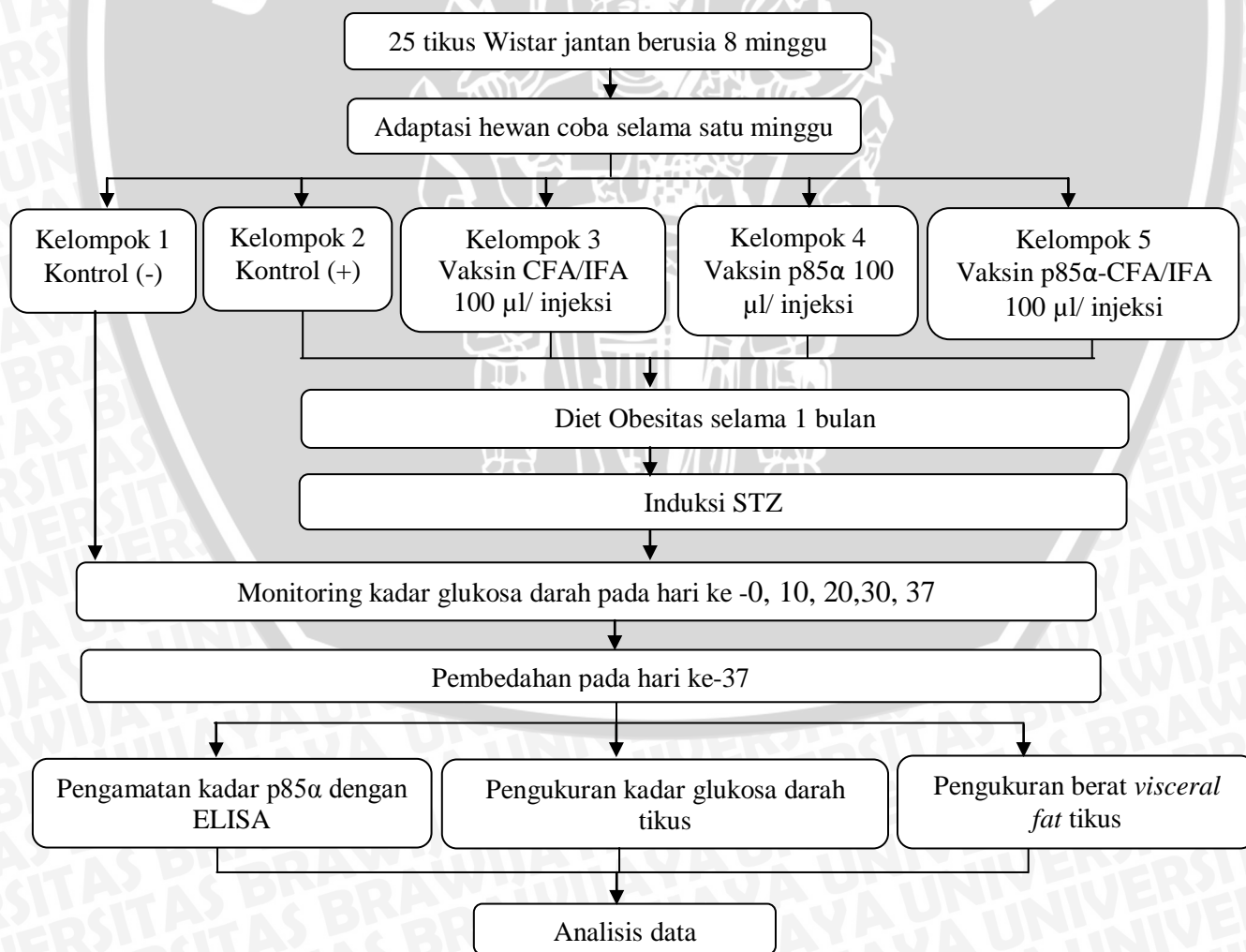
- Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8 minggu yang dibeli dari Pusvetma Surabaya.
- Enzim p85: *regulatory subunit enzyme* dari *phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI 3-kinase)*. *Human recombinant enzyme p85* pada *Leishmania tarentolae* dibeli dari Jena Bioscience, Germany.
- *Diet induce obesity*: diet tinggi lemak dan glukosa untuk menginduksi terjadinya obesitas pada tikus. Keadaan obesitas diperlukan untuk menyebabkan resistensi insulin pada tikus.
- Streptozotocin: pemberian streptozotocin dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya diabetes melitus pada tikus.

- Freund's Complete Adjuvant (CFA) dan Freund's Incomplete Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai ajuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Lab. Biomedik FKUB
- *Keyhole lymphote hemocyanin* (KLH): KLH digunakan sebagai protein karier, didapat dari CV Cristallindo Surabaya

4.5 Lokasi dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Farmakologi FKUB.

4.6 Alur Kerangka Kerja Penelitian



4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Perawatan tikus

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

4.7.2 *Diet-induced obesity*

Alat : Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan

Bahan : Diet normal : susu-PAP, terigu, dan air. *Diet induced obesity* : susu-PAP dan terigu, minyak babi, maltodextrin, sukrosa, kasein, tepung jagung, dan air (Wang,2007).

4.7.3 Induksi Diabetes Mellitus

Streptozotocin 20 mg/kg, sterile citrate buffer.

4.7.4 Konjugasi dan *Coupling* Protein Karier

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 2 mg, MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) pH 4.5-5 0.1 M, EDC 10 mg, Hapten (p85), Purification buffer: 0.083 M sodium phosphate, 0.9 M NaCl, pH 7.2, Gel filtration column: Menggunakan gel filtration column with a MW cut-off of 5000-6000.

4.7.5 Penambahan Ajuvan

- Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml
- Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml

4.7.6 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Glucotide strips, glukometer, jarum steril

4.7.7 Pembedahan Tikus

Alat : Gunting bedah², Pinset 2, Jarum pentul 2 set, Steroform 2, Kapas

Bahan : Kloroform 20 ml, Alkohol, Wadah plastic+tutup 25 buah, S spuit insulin 1 ml

4.7.8 Pengukuran kadar p85 pada jaringan lemak tikus dengan

ELISA

Alat: multichannel pipet, blue tip, yellow tip, white tip, mikropipet, vortex, tube, sentrifuge, ELISA reader

Bahan: PBS, BSA 1%, tween, Substrate TMB, antibodi AGE, Antibodi sekunder, coating buffer, dan HCL 1 N

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Induksi Diabetes Melitus

STZ (Streptozotocin) dimasukkan kedalam 50mM-*citric acid buffer*.

Tikus wistar dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal 20 mg/kgbb. Injeksi dilakukan 5 hari berturut-turut dan akan mengalami kondisi hiperglikemiapada hari ke-7. Tikus dianggap mengalami diabetes apabila *non fasting bloodglucose* mencapai 200mg/dl dalam dua hari berturut-turut (Arora, 2009).

4.8.2 Diet-induced obesity

Pembuatan *diet-induced obesity* dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 30g/100gBB sehingga komposisi untuk tiap tikus perlakuan adalah

30 gram yang terdiri dari *Diet induced obesity* : susu-PAP dan terigu, minyak babi, sukrosa, kasein, tepung jagung, dan air. *Diet-induced obesity* diberikan selama 4 minggu pada kelompok perlakuan 2, 3, 4, dan 5.

4.8.3 Konjugasi dan *Coupling* Protein Karier

Tambahkan 2 mg KLH yang terlyopilisasi ke dalam 200 μ l buffer konjugasi. Larutkan 2 mg peptide atau haptan dalam 500 μ l dari buffer konjugasi. Tambahkan 500 μ l cairan peptide ke dalam 200 μ l cairan protein karier. Larutkan 10mg EDC dalam 1ml deionized water dan segera tambahkan 50 μ l cairan ini ke dalam cairan peptide-karier.

4.8.4 Penambahan Ajuvan

Baik CFA dan IFA siap digunakan dalam suspensi cair tanpa memerlukan proses persiapan sebelumnya. Campur CFA/IFA dengan antigen (hasil konjugasi *gingipain* – KLH) dengan perbandingan 1:1. Campur dengan *vortexing*.

4.8.5 Injeksi Vaksin

Vaksin diinjeksikan secara intraperitoneal sebanyak 100 μ L/injeksi setiap 2 minggu sekali selama 7 minggu. CFA diberikan pada saat injeksi pertama kali, sedangkan IFA diinjeksikan sebagai booster sebanyak 3 kali setiap 2 minggu sekali.

4.8.6 Pengukuran kadar glukosa darah tikus

Konsentrasi glukosa dalam darah diukur secara enzimatik dari 10 μ L volume darah yang diambil dari ekor tikus, dan menggunakan

Glucotide strips dan *Glucometer*. Pengukuran dilakukan pada hari 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 untuk mengetahui tingkat sensitivitas insulin.

4.8.7 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas steroform, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Potong usus halusnya terlebih dahulu kemudian diambil darahnya dengan spuit 5ml melalui jantung untuk pemeriksaan ELISA dan organ hepar dan otot skelet untuk pemeriksaan ELISA.

4.8.8 Pengukuran kadar p85 pada jaringan lemak tikus dengan menggunakan ELISA

Prosedur pengukuran dengan coating antigen 1:20, overnight T4 kemudian dicuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit. Kemudian blocking dengan BSA 1% selama 30 menit. Dicuci kembali dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit. Antibodi primer 1:500 dalam PBS di inkubasi selama 1 jam. Sel dicuci kembali dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit. Antibodi sekunder anti rabbit 1:1000 dengan inkubasi 1 jam. Cuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit. SA-HRP 1:1000 diinkubasi selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit. Kemudian ditambahkan Sureblue TMB dan diinkubasi 30 menit. Tanpa

membuang Sureblue TMB, reaksi distop dengan HCl 1N, inkubasi 15 menit. Kemudian dibaca ELISA reader ($\lambda=450\text{nm}$)

4.8.9 Purifikasi antibodi dengan metode SAS

Pemurnian antibodi dilakukan dengan teknik presipitasi Sodium Ammonium Sulfat (SAS) 50% jenuh. Pembuatan SAS 50% yaitu dengan Ammonium sulfat ditambahkan dengan H₂O hingga 10ml. 100ml serum ditambahkan dengan 100ml SAS 50% dengan perbandingan 1:1. Vortex tiap 10–15 menit selama 15–60 menit. Inkubasi pada suhu 4°C. Vortex 1 menit dan inkubasi 4°C selama 5–10 menit. Sentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Ambil pellet, buang supernatan. Tambahkan SAS 50% dengan perbandingan 1:2. Kemudian homogenkan dan sentrifuge pada 6.000rpm selama 10 menit pada 4°C. Buang supernatant, ambil pellet. Pellet dilarutkan dengan 100ml buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 sebanyak 1.000ml pada suhu 4°C selama semalam, kemudian dialysis untuk selofan yang telah diisi antibodi.

4.9 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan hari ke 50. Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian untuk menentukan varian data sama atau tidak. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova*

dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 18.

