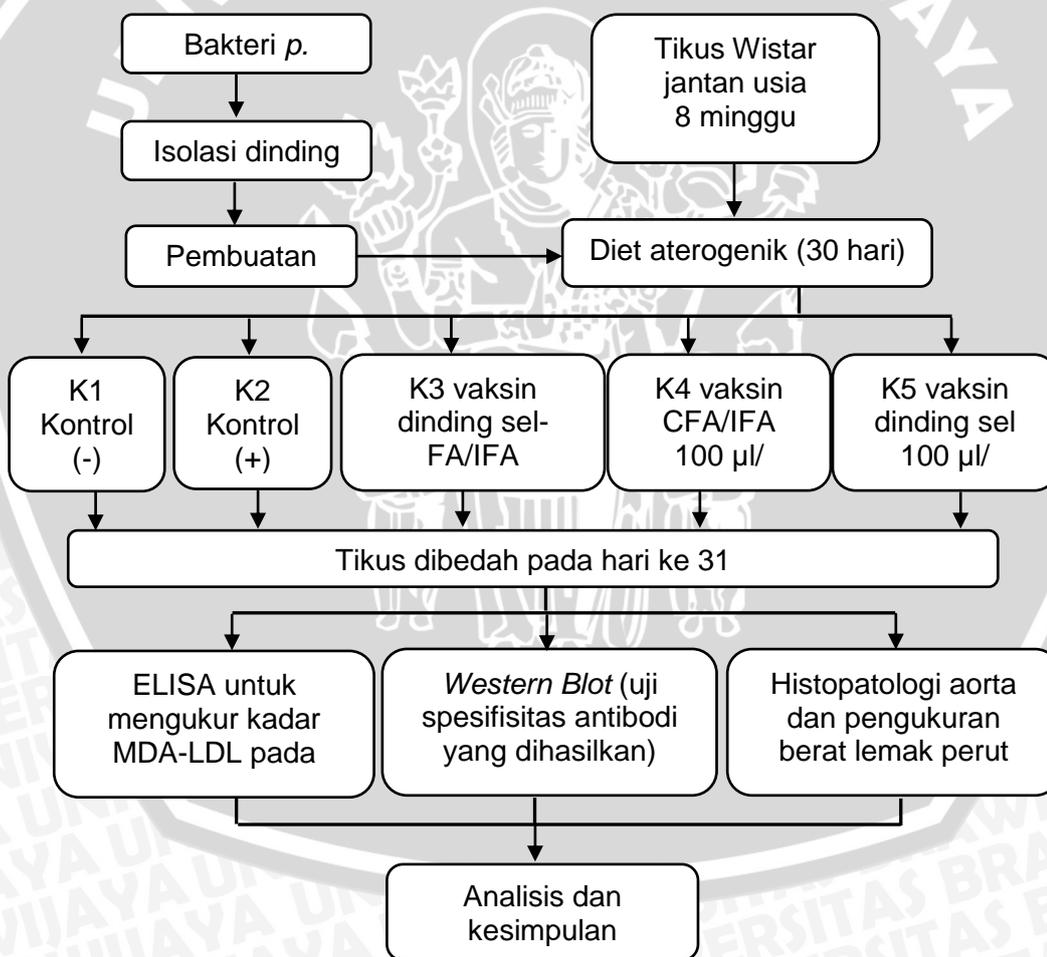


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus novergicus* strain wistar). Desain penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Bagan Desain Penelitian



4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan usia 7-8 minggu dengan berat 120–170 gram. Tikus wistar dipilih karena merupakan hewan coba yang dapat dibuat menjadi model aterosklerosis sebab rentan terhadap aterosklerosis. Tikus jantan dipilih karena tikus jantan tidak ada pengaruh dari faktor hormonal seperti pada tikus betina. Tikus yang dipilih masuk ke dalam kriteria inklusi sebagai berikut :

- Hewan coba yang digunakan tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar jantan
- Usia 7-8 minggu
- Berat 120–170 gram
- Berbulu putih dan bersih
- Berada dalam keadaan sehat dan aktif

Kriteria eksklusi adalah sebagai berikut :

- Tikus yang sakit dan asupan makanan kurang pada saat penelitian
- Tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu : kelompok 1 / K1 (Kontrol negatif), kelompok 2 / K2 (Kontrol positif), kelompok 3 / K3 (vaksin dinding sel-CFA/IFA), kelompok 4 / K4 (vaksin CFA/IFA), dan kelompok 5 / K5 (vaksin dinding sel). Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut :

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

p : jumlah perlakuan (lima (5) : kelompok K1,K2,K3,K4,K5)

n : jumlah ulangan

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

$$4 n \geq 15$$

$$n \geq 3,75$$

Diperoleh hasil perhitungan 3,75 sehingga dibulatkan ke atas menjadi 4 pengulangan. Hewan coba yang dibutuhkan adalah minimal 4 ekor untuk setiap kelompok atau secara keseluruhan dibutuhkan 25 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin aterosklerosis dengan menggunakan berbagai bahan yaitu CFA/IFA, dinding sel *P. gingivalis*-CFA/IFA, dinding sel *P. gingivalis* yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

1. K1 : merupakan kelompok kontrol negatif yang diberikan diet normal dan tanpa pemberian vaksin.
2. K2 : merupakan kelompok kontrol positif yang diberikan diet aterogenik dan tanpa pemberian vaksin.
3. K3 merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksi vaksin CFA/IFA 100 μ l.
4. K4 : : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksi vaksin dinding sel *P. gingivalis*-CFA/IFA 100 μ l.
5. K5 : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksi vaksin dinding sel *P. gingivalis* 100 μ l.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: (a) spesifisitas antibodi dalam serum, (b) ketebalan dinding aorta (c) kadar MDA-LDL pada serum tikus (d) berat lemak perut tikus. Penelitian ini merupakan bersama yang lolos

PIMNAS 26 UNRAM. Pada tugas akhir ini, penulis akan membahas variabel tergantung berat lemak perut tikus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

- Lokasi : Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Patologi Anatomi, Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Waktu Penelitian : Maret s/d Juli 2013.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Perawatan Tikus

Alat yang digunakan adalah : 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, timbangan analitik, *handscoon*, dan pembersih kandang. Bahan yang digunakan adalah : sekam dan air minum untuk tikus.

4.5.2 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal

Alat yang digunakan adalah : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, penggiling pakan, dan nampan. Bahan untuk diet normal adalah : susu-PAP 64%, terigu 35%, dan air 1%.

4.5.3 Pembuatan Ransum Makanan Diet Aterogenik

Alat yang digunakan adalah : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan. Bahan diet aterogenik adalah : Pars 55%, Tepung terigu 12%, Asam Cholat 1%, PTU 0.1%, Kolesterol

2%, Minyak Babi 10%, Air 10%, Kuning Telur Bebek 8% (Raja, 2012; Chen et al., 2004; Pellizzon, 2008).

4.5.4 Kultur Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Alat: agar plate, anaerob candle jar, microbact test kit, long wave UV light fluorescence. Bahan: brucella broth, tripticase soy agar, 10% defibrinated horse blood, 5µg/L hemin, 0.4 µl/ml vit.K1 (Aziz, 2011).

4.5.5 Isolasi Dinding Sel dari Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Alat: pipet, mikropipet, elektroforesis. Bahan: supernatan bakteri *P. gingivalis*, acrylamide 30%, SDS 10%, APS 10%, running buffer, EPS, TEMED, EtOH.

4.5.6 Penambahan Adjuvant

Bahan: Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml.

4.5.7 Pembedahan Tikus

Alat : Gunting bedah 2 buah, Pinset 2 buah, Jarum pentul 2 set, Steroform 2 buah, Kapas. Bahan: kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, alkohol, wadah plastik 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, vacuotainer 25 buah.

4.5.8 Uji Spesifisitas Antibodi dengan Western Blot

Alat: eppendorf, sentrifuge, mikropipet, software corel photo. Bahan: membran nitroselulosa, serum mencit, TBS tween 0.05%, TBS skim milk 5%, Ponceau 2%, antibodi primer *gingipain*, antibodi sekunder, SAHRP, substrat TMB.

4.5.9 Penimbangan Berat Lemak Perut

Alat yang digunakan adalah : timbangan analitik, pinset, dan aluminium foil.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- a. Tikus wistar : merupakan hewan coba dengan jenis *Rattus norvegicus* strain wistar berjenis kelamin jantan. Tikus wistar dibeli dari peternak tikus lokal di Kota Malang. Tikus berusia 7 – 8 minggu dengan berat 120–170 gram.
- b. Diet aterogenik : pemberian diet aterogenik dimaksudkan untuk menginduksi pembentukan plak aterosklerosis pada subendotel aorta tikus.
- c. Diet normal : merupakan diet/pakan biasa tanpa tambahan bahan aterogenik.
- d. *P. gingivalis*: bakteri dibeli dari laboratorium mikrobiologi fakultas kedokteran gigi UNEJ (Universitas Negeri Jember).
- e. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama sedangkan IFA digunakan sebagai vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- f. *Abdominal visceral fat* : merupakan lemak perut tikus yang berada baik di intraperitoneum maupun retroperitoneum.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan Tikus

Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi tikus dan ditimbang berat badan sebelum penelitian dengan neraca sartorius. Makan dan

minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti dua kali seminggu. dan tikus ditimbang setiap minggunya.

4.7.2 Pembuatan Diet Normal

Diet normal merupakan diet yang diberikan untuk kelompok 1 / K1 (kontrol negatif). Diet normal merupakan asupan normal tikus dan tidak menimbulkan efek aterogenik. Diet normal dibuat dengan mencampur bahan-bahan dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 4.1 Tabel Komposisi Diet Normal

PAR-S	Tepung terigu	Air
24 gram	15,5 gram	0,5 gram
Total diet normal = 40 gram/tikus/hari		

Bahan-bahan dicampur pada wadah. Kemudian, ditimbang dan dibentuk bulat dengan berat masing-masing 40 gram untuk setiap tikus. Pemberian makan diberikan setiap hari, selama 30 hari. Sisa makanan ditimbang tiap hari.

4.7.3 Pembuatan Diet Aterogenik

Diet aterogenik merupakan diet yang diberikan kepada kelompok perlakuan K2 (kontrol positif), K3, K4 dan kelompok K5. Diet diberikan dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 4.2 Tabel Komposisi Diet Aterogenik

PAR-S	Tepung Terigu	Asam Cholat	Minyak babi	PTU	Kolesterol	Kuning Telur	Air
22 gr	4,8 gr	0,05 gr	4 ml	0,01 gr	0,8 gram	2 gr	4 gr
Total diet aterogenik = 40 gram/tikus/hari							

Bahan-bahan dicampur pada wadah. Kemudian, ditimbang dan dibentuk bulat dengan berat masing-masing 40 gram untuk setiap tikus. Pemberian makan diberikan setiap hari, selama 30 hari. Sisa makanan ditimbang tiap hari.

4.7.4 Kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* dipindahkan kedalam 2 ml *brucella broth*. *Brucella broth* kemudian diletakkan pada selektif *trypticase soy agar* (TSA) yang telah mengandung 10% *defibrinated horse blood*, 5- $\mu\text{g/ml}$ hemin, and 0.4- $\mu\text{l/ml}$ vitamin K1. Kemudian diinkubasi selama 72 jam pada 37°C, dalam kondisi anaerob (90% N₂/10% CO₂). Bakteri dipilih berdasarkan ukuran, warna, bentuk, pewarnaan, dan tes biokimia. *P. gingivalis* memiliki ciri-ciri koloni berwarna hitam, dan merupakan bakteri gram batang batang yang dipastikan dengan fluoresensi dengan *long wave UV light*. Fluoresensi dianggap sebagai tes taksonomi cepat untuk membedakan antara *gingivalis P.* dengan bakteri anaerobik koloni hitam dan gram batang negatif hitam lainnya. Isolat tersebut kemudian diidentifikasi sebagai *Porphyromonas gingivalis* berdasarkan tes katalase dan indole, fermentasi glukosa dan *sheep red blood cell agglutination* (Aziz, 2011).

4.7.5 Penambahan Adjuvant

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

4.7.6 Isolasi Dinding Sel dari Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Sel bakteri dari kultur dipisahkan dari media dengan sentrifugasi 10.000 g selama 15 menit. Supernatan dicampur dengan amonium sulfat dengan saturasi 40% selama 2 jam. Sentrifugasi 20.000 g selama 40 menit kemudian pellet disuspensi dengan tris buffer pH 9,5 dan dithiothreitol (DTT). Suspensi didialisa

overnight dengan 6 liter buffer yang sama. Vesikel kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi 27.000 g selama 40 menit kemudian diresuspensi dengan 10 ml tris buffer pH dan DTT. Sentrifugasi 27.000 g selama 40 menit kemudian vesikel diresuspensi dengan 1,5 tris buffer pH 7,2 dan disimpan pada suhu -40°C untuk digunakan dalam pembuatan vaksin (Grenier and Mayrand, 1987).

4.7.7 Injeksi Vaksin

Vaksin diinjeksikan secara intraperitoneal sebanyak 100 μL /injeksi pada hari ke-0, ke-14, dan ke-28. CFA diberikan saat injeksi pertama kali pada hari ke-0, sedangkan IFA diinjeksikan sebagai *booster* diberikan pada hari ke-14, ke-28.

4.7.8 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. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil aortanya dan fiksasi ke dalam formalin 10%. Lalu diambil lemak perut tikus (*abdominal visceral fat*).

4.7.9 Uji Spesifisitas Antibodi dengan Menggunakan Western Blot

Spesifisitas antibodi pada serum darah tikus dilihat menggunakan metode hasil *Western Blot*. Proses *Western blot* diawali dengan elektroforesis *SDS PAGE*. Band protein pada gel hasil elektroforesis dipindahkan ke membran nitroselulose menggunakan aliran listrik pada mesin pentransfer selama 2 jam. Selanjutnya membran diletakkan pada *TBS-skim milk* 5% selama 1 malam pada suhu 4°C sebagai *blocking agent*. Setelah 1 malam, membran dibilas dengan *TBS-tween* 0.05% selama 2 kali 10 menit. Kemudian diberikan antibodi primer spesifik terhadap anti-*gingipain* tikus (Cusabio) dan ditunggu selama 1 malam

pada suhu 4°C. Setelah 1 malam, membran dibilas dengan *TBS-tween* 0.05% selama 2 kali 10 menit. Selanjutnya antibodi sekunder diberikan pada membran dan ditunggu selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah 2 jam, membran dibilas dengan *TBS-tween* 0.05% selama 2 kali 10 menit. Berikan SAHRP pada membran dan tunggu selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah 1 jam, membran dibilas dengan *TBS-tween* 0.05% selama 2 kali 10 menit. Berikan substrat TMB pada membran di ruang gelap selama 20 menit, dan bilas dengan air. Pada membran nitroselulosa tersebut akan terlihat band antibodi anti-*gingipain* yang spesifik. Masukkan gambar membran pada komputer dan dilakukan analisis kadar dengan menggunakan *software corel photo*.

4.7.10 Penimbangan Berat Lemak Perut

Berat lemak perut tikus diambil dari lemak intraperitoneal dan retroperitoneal. Lemak ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik, alumunium foil dan pinset dan selanjutnya dilakukan pencatatan hasil.

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran berat lemak perut tikus dianalisis secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows XP* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test (uji Least Significant Difference)*, Uji korelasi *Pearson*.