

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1. Desain Penelitian

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

### 4.2. Variabel Penelitian

#### 4.2.1. Variabel Bebas

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

#### 4.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah tekanan darah.

### 4.3. Objek dan Sampel Penelitian

#### 4.3.1. Pemilihan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar. Pemilihan sampel dilakukan secara acak karena hewan coba, jenis pakan, dan bahan penelitian lainnya dianggap homogen. Tikus diperoleh dan dipelihara di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Kriteria untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut:

- Tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan
- Usia 6–8 minggu
- Berat 120 – 160 gram

d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif

#### 4.3.2. Jumlah sampel

Perhitungan pengulangan sampel menggunakan rumus Federer (1963) dalam (Wahyuni, 2008) adalah sebagai berikut :

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

p : jumlah perlakuan, n : jumlah pengulangan

pada penelitian ini p = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah :

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

$$4 n - 4 \geq 15$$

$$4 n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

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

| Kelompok                            | N | Induksi dan Perlakuan   |
|-------------------------------------|---|---|
| Kontrol Negatif                     | 5 | Tidak diinduksi DOCA dan vaksin<br>Perlakuan : diberi minum air tanpa garam   |
| Kontrol Positif<br>(DOCA)           | 5 | Diinduksi DOCA tanpa vaksin<br>Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%   |
| Perlakuan 1<br>(DOCA + Vaksin)      | 5 | Diinduksi dengan DOCA dan vaksin OMP 100µl/injeksi.<br>Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1%                               |
| Perlakuan 2<br>(DOCA+Vaksin+Ajuvan) | 5 | Diinduksi dengan DOCA dan diberikan vaksin OMP 100µl/injeksi serta ajuvan CFA/IFA<br>Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1% |

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| Perlakuan 3<br>(DOCA+Ajuvan) | 5 | Diinduksi DOCA dan diberi ajuvan CFA/IFA saja<br>Perlakuan : diberi minum air garam NaCl 1% |
|------------------------------|---|---|

#### 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, 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.
- c) Vaksin hipertensi diambil dari isolasi outer membrane protein (OMP) *P.gingivalis* dan diberikan kepada hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 100 µl/injeksi setiap 10 hari sekali selama 40 hari.

- 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.
- e) Pengukuran tekanan darah tikus dilakukan dengan menggunakan alat *Blood Pressure Analyzer* merk IITC yang diletakkan pada ujung proksimal ekor tikus dengan 5 kali pengukuran kemudian dirata-rata.

#### 4.6. Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.6.1. Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm berserta 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 Induksi Hipertensi

Alat dan bahan yang diperlukan adalah NaCl 1%, DOCA, minyak jagung, neraca miligram, spuit 1 cc, dan *handscoon*.

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

Alat dan bahan yang diperlukan adalah agar plate, anaerob candle jar, microbact test kit, brucella broth, tripticase soy agar, 10% defibrinated horse blood, 5µg/L hemin, 0.4 µl/ml vit.K1.

##### 4.6.4 Alat dan Bahan untuk Isolasi OMP *P. gingivalis*

Alat dan bahan yang diperlukan adalah hasil kultur *P.gingivalis* dalam *broth*, *Pili cutter*, sentrifus, *vortex*, mikropipet, falcon, *Triklor acetit acid* (TCA) 3%, PBS pH 7.4, *n-octyl β-D-glucopyranoside* (NOG) 1%, etanol.

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

Alat dan bahan yang diperlukan adalah pipet, mikropipet, alat elektroforesis. supernatant bakteri *P. gingivalis*, acrylamide 30%, SDS 10%, APS 10%, running buffer, EPS, TEMED, EtOH.

#### 4.6.6. Alat dan Bahan untuk Pembuatan Vaksin

Alat dan bahan yang diperlukan adalah spuit 1 cc, handscoen, kain lap, vortex, eppendorf, falcon. OMP *P.gingivalis*, CFA/IFA alkohol 70%.

#### 4.6.7. Alat dan Bahan untuk Penambahan Adjuvan

Alat dan bahan yang diperlukan adalah mikropipet, pipet, vortex, eppendorf, Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1 ml, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml, PBS, dan aquades.

#### 4.6.8. Alat dan Bahan untuk Pengukuran Tekanan Darah

Alat dan bahan yang diperlukan adalah *Blood Pressure Analyzer*, handscoen, tissue, penjepit ekor tikus.

#### 4.6.9. Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang diperlukan adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, vacuotainer 25 buah, kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, alkohol.

#### 4.6.10. Alat dan Bahan untuk Pengukuran Kadar MDA Darah

Alat dan bahan yang diperlukan adalah tabung reaksi, sentrifus, spektrofotometer visibel, bak es, pemanas air, EDTA, BHT, SDS, TBA, asam asetat, dan es.

#### 4.6.11. Alat dan Bahan untuk Dot Blot

Alat dan bahan yang diperlukan adalah Dot Blotter (Bio Rad), TBS Tween, Antibodi primer (Anti BST-2), NBT/BCIP *solution*, akuades, mikropipet, membran nitroselulosa.

#### 4.7. Prosedur Kerja Penelitian

##### 4.7.1 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 Membran Protein (OMP) 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° untuk kemudian dilakukan isolasi OMP.
- d) Pellet yang mengadung bakteri ditambah dengan PBS dan *n-octyl β D-glucoopyranoside* (NOG) 0.05% dengan perbandingan 1:1, dihomogenkan, didiamkan selama 1 menit pada suhu 4° 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*.
- b) Tuangkan *separating monomer solution* ke dalam *gel cassette*. Diamkan hingga gel mengeras.
- c) Tuangkan *stacking monomer solution* ke dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*. Tambahkan ddH<sub>2</sub>O untuk meng-adjust volume.
- d) Pasang cetakan (comb) ke dalam gel casting, dan masukkan ke dalam chamber.
- e) 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.
- f) 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.

- g) Lepaskan gel dari *gel cassette* secara perlahan. Masukkan ke dalam *staining box*. Tuangkan larutan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Inkubasi selama  $\pm$  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 100 $\mu$ L/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. Penambahan Ajuvan

- a) Dicampur CFA/IFA dengan OMP *P.gingivalis* ke dalam falcon dengan perbandingan 1:1.
- b) Dicampur dengan rata dengan menggunakan *vortex* selama 2 jam.
- c) Diuji kesolidan suspensi dengan meneteskan campuran OMP dan CFA/IFA pada larutan aquades.

#### 4.7.7. 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.

#### 4.7.8. 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.
- b) Mengukur tekanan darah 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 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 dan kadar MDA

#### **4.7.10. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA) Darah**

- a) Dimasukkan darah sebanyak 1 ml dalam tabung reaksi yang sudah berisi antikoagulan (EDTA)
- b) Tabung reaksi dibolak-balik sehingga tercampur sempurna, kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu 4 °C (di dalam es).
- c) Tabung disentrifus pada kecepatan 400 rpm selama 10 menit, setelah itu ambil plasma dengan pipet mikro
- d) Dicampurkan 700 mikroliter plasma darah dengan 200 mikroliter larutan SDS, 50 mikroliter larutan BHT, 50 mikroliter larutan EDTA, 1500 mikroliter larutan asam asetat, dan 1500 mikroliter larutan TBA
- e) Campuran kemudian dipanaskan dalam pemanas air pada suhu 100 °C selama 60 menit, kemudian campuran diangkat dan didinginkan dalam bak es
- f) Sentrifugasi dengan kecepatan 2335 rpm selama 10 menit.

- g) Absorbansi supernatan diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 532 nm. Dilakukan *check sample* secara duplikat, nilai absorbansi kemudian dikonversikan ke dalam mikro mol/liter

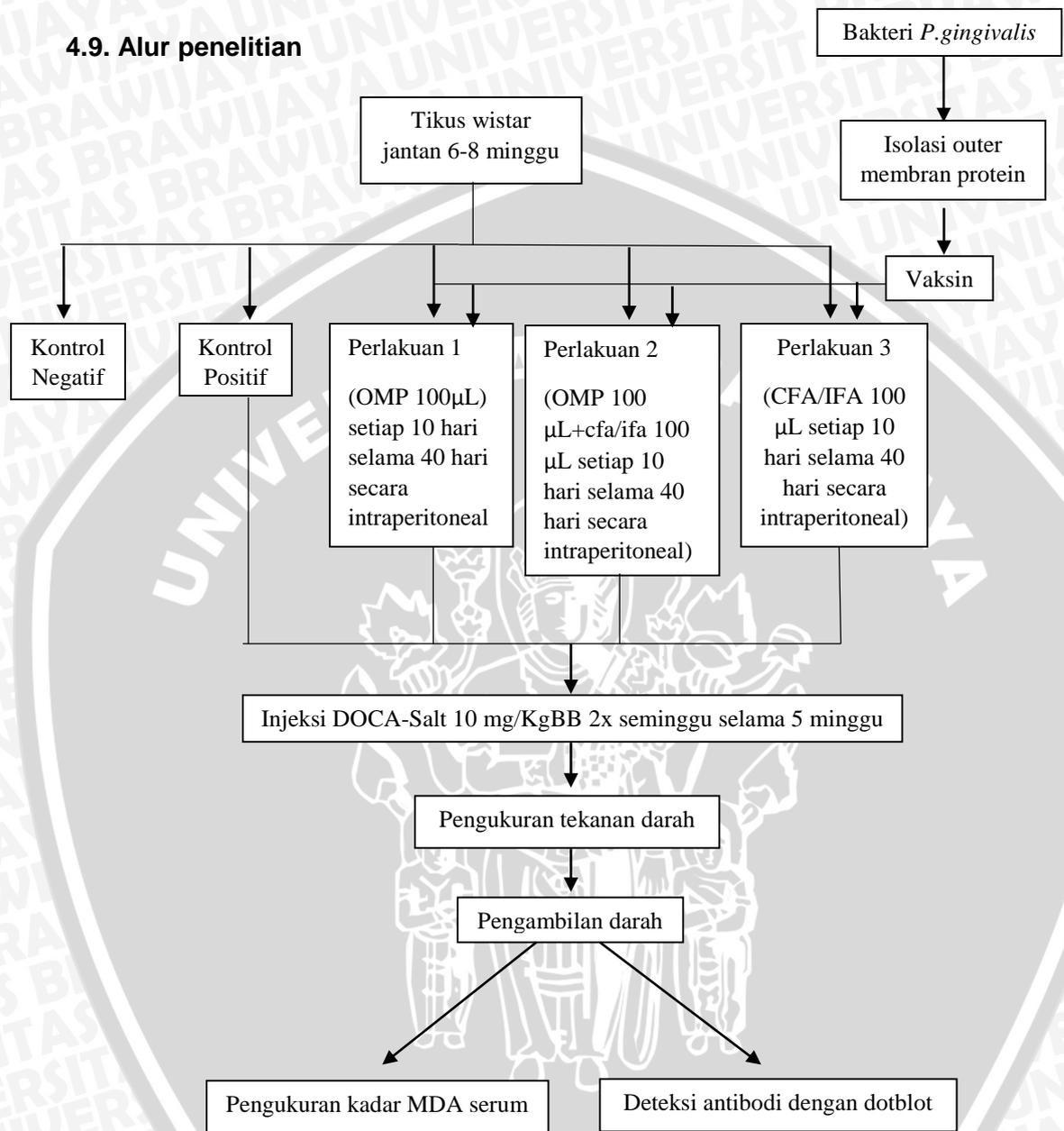
#### 4.7.11. Deteksi Antibodi dengan Dot Blot

- h) Uji dot blot diawali dengan merangkai membran pada alat Dot Blotter (BioRad) selanjutnya membran ditetesi dengan sampel dengan konsentrasi 50 ml.
- i) Diinkubasi selama 30 menit dan *blocking* dengan TBS tween.
- j) Direaksikan dengan antibodi primer Anti BST-2 dengan pengenceran (8:1000) dan kemudian membran dicuci dengan TBS + PBS Tween 0.05%
- k) Diinkubasi dengan antibodi sekunder Anti rat IgG Alkaline Phosphatase dengan pengenceran 1: 1000 selama 1 jam.
- l) Membran dicuci dengan TBS lalu diinkubasi dengan substrat NBT/BCIP solution. Dilakukan stop reaksi dengan akuades, hasil positif apabila terbentuk dot-dot pada membran nitroselulosa. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna

#### 4.8. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc Tukey*.

4.9. Alur penelitian



Gambar 4.1. Alur Penelitian

