

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group desain*, yaitu dalam rancangan ini perlakuan atau intervensi telah dilakukan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau post tes. Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus Norvegicus* strain wistar (Notoatmodjo, 2010)

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Usia 8-12 minggu
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat
- d. Tidak mengalami pengobatan atau paparan sebelumnya

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit pada masa penelitian
- b. Tikus mati pada masa penelitian

4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subject penelitian, yaitu:



1. Kontrol negatif (K-) : diet normal
2. Kontrol positif (K+) : diet normal, dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
3. Perlakuan 1 (P1) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$, dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
4. Perlakuan 2 (P2) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 30 $\mu\text{g/ml}$, dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
5. Perlakuan 3 (P3) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 45 $\mu\text{g/ml}$, dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai kelompok mencit yang diinfeksi dengan *Vibrio cholera* dan diberi imunoterapi dengan IgY anti *Vibrio cholera* dengan dosis 20 mikrogram/ml (Jiwintarum *et al*, 2014)

4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Menurut perhitungan ferderer, rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut

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

Dengan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 6 kali. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $6 \times 5 = 30$ hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah antibodi imunoglobulin y (IgY) dengan berbagai konsentrasi.

4.3.2 Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah ekspresi IL-1 β tikus putih *Rattus Norvegicus* strain wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian dilakukan pada tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat kultur dan pemeliharaan bakteri *P. gingivalis*
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat ekstraksi antibodi IgY
3. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan
4. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat uji ELISA- kit IL-1 β Rat.

4.4.2 Waktu

Penelitian ini berlangsung selama 4 bulan, yaitu pada bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2016.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat/Instrumen penelitian

1. Alat Pemeliharaan Hewan coba
 - a. Kandang dari bak plastik
 - b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
 - c. Botol air untuk minum
 - d. Timbangan
 - e. Tempat pakan
 - f. Form pemantauan sisa pakan tikus dan form pemantauan berat badan tikus
2. Alat Pembuatan Makanan Tikus
 - a. Baskom plastik
 - b. Timbangan
 - c. Pengaduk
 - d. Handscoon
 - e. Gelas ukur
 - f. Sonde
3. Alat ekstraksi antibodi IgY
 - a. Sendok
 - b. Lancet
 - c. Tube 50 ml
 - d. Gelas ukur
 - e. Pengaduk
 - f. Vortexer
 - g. Rolling mixer
 - h. Sentrifugasi



4. Alat pemeriksaan ekspresi IL-1 β
 - a. ELISA Kit

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Diet Normal (PARS, tepung terigu, air)
2. Bakteri *P. gingivalis*
3. Telur ayam
4. Alkohol
5. Xylol
6. Buffer formalin
7. *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000

4.6 Definisi Operasional

1. Antibodi IgY adalah antibodi yang diambil dari kuning telur ayam yang telah induksi bakteri *P.gingivalis*, proses pengambilan dilakukan dengan proses presipitasi menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000.
2. IL-1 β adalah sitokin yang dihasilkan oleh makrofag yang diinduksi oleh produk bakteri *P.gingivalis* yang dapat mengakibatkan kerusakan sel fibroblas pada gingiva dan memicu terjadi resorpsi tulang alveolar dalam serum darah tikus model periodontitis yang dihitung menggunakan metode ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) dengan satuan pg/ml

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemberian Pakan Tikus

Kebutuhan pakan tikus perhari adalah 40 gram perhari (Muwani, 2006). Seluruh tikus dalam seluruh kelompok mendapatkan diet makanan normal 40 gram per hari.

4.7.2 Pemilihan Tikus Galur Wistar

1. 30 ekor tikus putih (*Rattus Novergicus* strain wistar) dipilih yang memenuhi syarat sampel, kemudian dibagi dalam 5 kelompok kontrol. Cara pemilihan tikus yaitu dengan memberi nomor urut pada tiap tikus, kemudian nomor undian ditulis pada kertas kecil lalu dilipat dan dimasukkan dalam kotak undian. Pemilihan secara acak agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan
2. Hewan coba (tikus) ditempatkan dalam kandang terpisah (1 kandang per ekor)
3. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan, dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari
4. Masing-masing perlakuan pada tikus dilakukan secara bersamaan selama 8 minggu
5. Pada akhir percobaan dilakukan pembedahan terhadap tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian diukur ekspresi IL-1 β

4.7.3 Identifikasi Bakteri *P. gingivalis*

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. gingivalis* yang dikultur terlebih dahulu kemudian dilakukan konfirmasi melalui identifikasi morfologi bakteri dengan uji perwarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram bakteri standar strain *P. gingivalis* yang diperiksa dengan mikroskop yang ditunjukkan dengan gambaran murni rantai bakteri basilus berwarna ungu.

4.7.4 Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Cara membuat suspensi *P.gingivalis* adalah dengan mencampur 2 ml larutan *BHI-B* steril dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis* dan dihomogenkan diatas sentrifuge. Setelah dilakukan pengenceran

dan penambahan aquades steril diukur absorbansinya dengan standar Mc Farland 0,5 dengan absorbansi 0,05 dan panjang gelombang 560 nm menggunakan spektrofotometer (Ermawati T, 2013).

4.7.5 Produksi antibodi IgY *P. gingivalis*

Menggunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* 24 minggu betina yang siap bertelur. Ayam diimunisasi dengan 0,5 ml suspensi *P.gingivalis* dalam *Freund adjuvant complete* secara subkutan selama 1 minggu, dengan perlakuan satu kali selama seminggu (Carlender, 2002), kemudian dilanjutkan dengan menyuntik 1 ml suspensi bakteri *P.gingivalis* dalam IFA (*Freund adjuvant incomplete*) pada minggu ke-2 secara subkutan. Satu minggu setelah perlakuan kedua, dilakukan ekstraksi IgY.

Ekstraksi IgY diawali dengan mengambil kuning telur yang dipisahkan dari bagian putih telur, kemudian diletakan diatas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur di lubangi dengan cara diangkat dengan pinset, cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4. Setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi 5,0 sampai 5,2 dan disimpan pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil dan diperoleh *Water Soluble Fractination* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7.5. Ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6000 dan amonium sulfat. PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi serta mengendapkan IgY (Poison et al dalam Pauly D, 2011). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan (Harlow & Lane, 1988).

4.7.6 Aplikasi antibodi IgY

Vaksin pada tikus wistar dilakukan 1 hari sebelum induksi OMP dari bakteri *P.gingivalis*. Induksi vaksin *immunoglobulin Y* dari kuning telur ayam dilakukan dengan menginjeksi secara langsung melalui sulkus gingiva dari tikus.

Vaksin diberikan 1 kali karena memiliki waktu paruh kurang lebih selama 28 hari (Jiwintarum et al, 2014) . Pada penelitian ini, igY diberikan dengan dosis sebesar 15 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 45 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.7 Injeksi *P.gingivalis* pada Tikus Wistar

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi bakteri *P.gingivalis* pada sulkus gingiva 0,05 μl dan diberikan 3 hari sekali selama 2 minggu menggunakan tuberculine syringe dengan ukuran jarum 30 gauge (Emawati T, 2013).



Gambar 4.1 Tuberculine Syringe (www.health.prenhall.com)

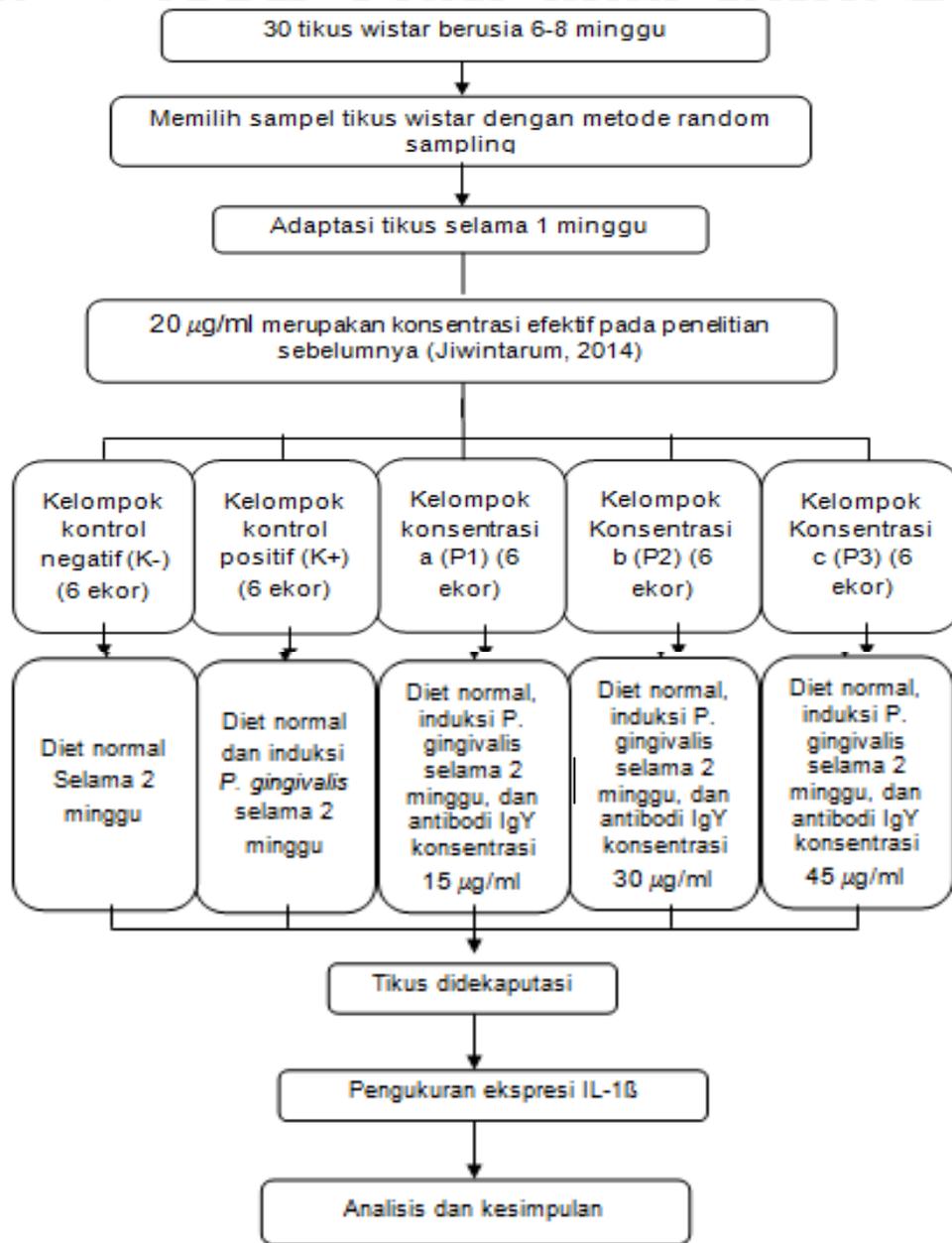
4.7.8 Pengambilan Sampel

Dilakukan pembedahan jantung tikus, dan pengambilan sampel darah sebanyak 3 cc. Kemudian darah disentrifuse untuk diambil serumnya, kemudian serum disimpan dalam freezer -20°C, sampai jumlah sampel mencukupi.

4.7.9 Pengukuran ekspresi IL-1 β

Pengukuran ekspresi IL-1 β menggunakan serum darah dari sampel darah yang sudah diambil. Kemudian dihitung titer IL-1 β menggunakan ELISA Kit IL-1 β Rat. Titer IL-1 β dihitung setelah didapatkan serum dari 30 sampel yang digunakan.

4.8 Alur Prosedur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Prosedur Penelitian

4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah 2 bulan penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengamatan ekspresi IL-1 β pada tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variences*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata IL-1 β antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *One Way Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$ dan hipotesis yang menyatakan bahwa antibodi IgY dapat menghambat peningkatan kadar IL-1 β yang diamati dari ekspresinya pada tikus putih (*Rattus Novergicus*) strain wistar terbukti. Namun apabila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak. H_0 pada penelitian ini adalah tidak ada beda ekspresi IL-1 β antar kelompok kontrol dan perlakuan, H_1 pada penelitian ini adalah terdapat beda ekspresi IL-1 β antar keompok kontrol dan perlakuan.

