

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Desain penelitian tersajikan dalam gambar 1 (terlampir).

**4.2 Populasi dan Sampel**

Sampel penelitian menggunakan model Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Federer, 1993):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75 \sim 5$$

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin *Amoebiasis* dengan menggunakan bahan *LecA* bakteri *Staphylococcus aureus* yang dibagi dalam kelompok:

- a. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang tidak dikondisikan *Amoebiasis* dan tanpa diberikan vaksinasi)
- b. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dikondisikan *Amoebiasis* tanpa diberikan vaksinasi)
- c. Kelompok 3: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan vaksinasi 0,3 cc/kg BB dan dikondisikan *Amoebiasis*
- d. Kelompok 4: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan vaksinasi 0,45cc/Kg BB dan dikondisikan *Amoebiasis*
- e. Kelompok 5: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan vaksinasi 0,6 cc/Kg dan dikondisikan *Amoebiasis*

#### 2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pembentukan abses hati.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Parasit, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini telah dilakukan selama 4 (empat) bulan mulai Februari 2013 sampai Mei 2013.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 1. Perawatan Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar

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.

##### 2. Isolasi *Staphylococcus aureus*

Sterile cotton pledget, 2 ml pre-reduced anaerobically sterilized Ringer solution, TSBV media, vortex mixer, biochemical test kit, gliserol, dan anaerobic jar.

##### 3. Kultur *Staphylococcus aureus*

Tryptic Soy Agar 40.0 g, Tripton Soy Broth 40.0 g, Brain Heart Infusion 40.0 g, Distilled Water 1000.0 ml.

##### 4. Ekstraksi Lec A

Protein marker, aquadest, dan alat elektroforesis.

##### 5. Adjuvant CFA dan IFA

Adjuvant CFA ditambahkan pada Lec A dengan perbandingan 1:1 pada booster pertama. Adjuvant IFA ditambahkan pada Lec A dengan perbandingan 1:1 pada booster kedua dan ketiga.

##### 6. Pengondisian *Amoebiasis*

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang telah divaksinasi dikondisikan terkena *Amoebiasis* dengan cara menginduksi Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan *Entamoeba histolytica*. Marker Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang terkena *Amoebiasis* dengan mengamati bentuk feses yang cair dan berlendir disertai darah.

##### 7. Pengambilan Darah

Syringe 3 ml, alkohol, dan kapas.

##### 8. Pengamatan Makroskopis

Eter, papan bedah, gunting bedah, benang dan jarum

#### 4.5 Definisi Operasional

##### 1. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina dengan berat sekita 200 gram.

##### 2. Pengondisian Amoebiasis

Hewan coba yang diberikan perlakuan dikondisikan terkena Amoebiasis dengan cara menginduksi *Entamoeba histolytica*. Penanda hewan coba (*Rattus norvegicus*) telah terinfeksi amoebiasis yang disebabkan oleh *Entamoeba histolytica* adalah dengan ditemukannya bentukan trophozoit dan disertai kemungkinan adanya pendarahan pada feses.

##### 3. *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* termasuk protozoa parasit dan bagian dari genus *Entamoeba*. (Rasmaliah, 2003)

##### 4. *Staphylococcus aureus*

Bakteri yang digunakan sebagai bahan untuk pembuatan vaksin dengan memanfaatkan Lec A yang terkandung dalam bakteri tersebut. (Houpt, 2004)

##### 5. Lec A

Merupakan protein yang mengikat *hydrophobic galactosides* dengan afinitas dan spesifitas yang tinggi.

##### 6. CFA dan IFA

Digunakan sebagai adjuvant vaksin. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 7. Abses Hati

Merupakan salah satu manifestasi klinis amoebiasis ekstraintestinal yang ditemukan pada hati. (Robbins, 2007)

#### 4.7 Metode Pengumpulan Data

##### 1. Kultur *Staphylococcus aureus*

Terdapat beberapa media yang digunakan untuk kultur *Staphylococcus aureus* yang memiliki susunan morfologi sel coccus bergerombol. Langkah pertama dalam pengkulturan *Staphylococcus aureus* adalah uji koagulase yang dilakukan terhadap koloni tersangka bacteria *Staphylococcus aureus*. Setelah itu, koloni pada media BAP (*Blood Agar Plate*) diambil sedikit dan ditanam kembali pada media MSA (*Manitol Salt Agar*), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, koloni yang sama diambil kembali dari media BAP (*Blood Agar Plate*) dan dikultur pada media penyubur BHI, inkubasi pada suhu 37°C, selama 12-18 jam.

##### 2. Isolasi *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* diambil dengan bantuan jarum ose. Pengambilan *Staphylococcus aureus* hanya seujung jarum ose yang telah dipanaskan terlebih dahulu. Pertama penumbuhan kultur bakteri dan proses pemanenan sel dengan cara menambahkan TE Buffer yang terdiri dari 1 ml 1 M Tris HCl; 0,2 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA; 98,8 AD dilakukan hingga volume akhir 100 ml dan selanjutnya larutan TE Buffer disterilisasi dengan autoclave dan kondisi pH 8,0. Proses selanjutnya adalah pelisisan bakteri. Ini dapat dilakukan dengan metode fisik (secara mekanik) atau dengan kimiawi menggunakan lisosim dan EDTA. Pelisisan bakteri ini diikuti oleh ekstraksi DNA. Tujuannya untuk memisahkan DNA dari komponen sel yang lain. Ekstraksi DNA dapat menggunakan pelarut organik seperti fenol dan kloroform atau dengan metode kromatografi. Tahap terakhir adalah pemekatan DNA dengan menggunakan presipitasi etanol.

### 3. Ekstraksi Lec A

Protein dari *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dilakukan elektroforesis untuk mendapatkan Lec A yang nantinya digunakan sebagai bahan aktif vaksin amoebiasis. Setelah dilakukan elektroforesis diperoleh band protein sesuai BM Lec A dan band yang mengandung Lec A dipotong untuk mengambil bahan aktifnya. Dimasukkan ke membrane dialisa untuk dilakukan elusi selama 30 menit dan didialisa selama 2 jam hari pertama aquades dan hari kedua PBS. Diambil cairan hasil dialisa untuk dijadikan vaksin.

### 4. Penambahan Adjuvant

Sediaan adjuvant CFA (Complete Freud Adjuvant) dan IFA(Incomplete Freud Adjuvant) siap digunakan dalam suspensi cair tanpa memerlukan proses persiapan sebelumnya. Alasan memilih CFA dan IFA pada pembuatan vaksin ini mempertimbangkan peningkatan IgG sehingga pembentukan antibodi dapat dipercepat. Campur adjuvant dengan Lec A dari *Staphylococcus aureus* dengan perbandingan 1:1. Campur dengan vortexing.

### 5. Pengondisian *Amoebiasis*

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina dengan berat sekitar 200 gram yang telah divaksinasi dikondisikan terkena *Amoebiasis* dengan cara menginduksi tikus dengan *Entamoeba histolytica* secara intra-rectal sebanyak 2 ml untuk setiap hewan coba.

### 6. Proses Vaksinasi

Vaksin diinjeksikan secara intra muscular (i.m). Pemberian vaksin sebanyak 0,1 cc/Kg BB; 0,15 cc/Kg BB; dan 0,2 cc/Kg BB untuk setiap kelompok perlakuannya pada minggu ke-5 penelitian (Chebolu, 2005).

## 7. Booster

Pada tahap booster dilakukan penginjeksian vaksin kedua kalinya secara intra peritoneal (i.p) pada minggu ke-9 penelitian. Dengan memberikan waktu satu bulan antara tahap vaksinasi dan booster 1 maka kadar IgG dapat diamati peningkatan atau perubahan kadar IgG pada tikus (Gaucher & Chade, 2002)

## 8. Pengambilan Darah

Darah diambil sebanyak 1 cc secara intra muscular (i.m) dengan syringe 3 ml pada minggu ke-10.

## 9. Pengamatan manifestasi klinis

Dilakukan pembedahan pada hewan coba *Rattus norvegicus* yang disedasi dengan menggunakan ether selama 10 menit pada setiap kelompok percobaan sesuai etik untuk diamati adanya abses di hati.

### 4.8 Pengolahan Data

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan minggu ke-15. Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya untuk mengetahui apakah ada pemebentukan abses hati. Analisis yang dilakukan adalah 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 ( $p > 0,05$ ) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama ( $p > 0,05$ ) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna tiap dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai  $p > 0,05$ . Uji statistik dilakukan dengan SPSS 17.