

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen murni menggunakan desain *true experimental in vivo, post test only, controlled group design* untuk mengetahui efek  $\beta$ -glucan *Candida albicans* dalam meningkatkan protektifitas mukosa usus halus mencit terhadap infeksi *Salmonella* Typhimurium.

Untuk meneliti hal tersebut subjek dibagi ke dalam 4 kelompok yang terdiri dari:

- a) Kelompok 1 : mencit yang tidak diinduksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan tidak diberi terapi obat (kontrol negatif).
- b) Kelompok 2 : mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan tidak diberi terapi obat (kontrol positif).
- c) Kelompok 3 : mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan diberi terapi siprofloksasin 15 mg/kgBB 2dd1.
- d) Kelompok 4 : mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan diberi  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g/hari.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain Balb/C yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya berusia 6 minggu, dengan berat 20-30 gram. Mencit Balb/C merupakan mencit yang sering digunakan untuk mempelajari patogenesis demam tifoid

(pada mencit yang diinfeksi *Salmonella Typhimurium*) (Ozkaya et al., 2012). *Salmonella Typhimurium* yang akan digunakan untuk menginduksi mencit berasal dari kultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.2.2 Sampel

##### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Mencit jantan *strain* Balb/C (*Mus musculus*) usia 6–12 minggu tanpa kelainan anatomis.
- b) Sehat pada masa aklimatisasi yang berlangsung selama 1 minggu.

##### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

Mencit mati selama penelitian.

##### 4.2.2.3 Besar Sampel

Teknik yang digunakan untuk pemilihan sampel dari populasi adalah *simple random sampling*, karena teknik ini dapat meminimalisir bias. Jumlah minimal sampel yang dibutuhkan dihitung menggunakan rumus  $p(n-1) \geq 15$ , dengan  $p$  merupakan jumlah perlakuan dan  $n$  adalah jumlah sampel per kelompok. Pada penelitian ini, jumlah perlakuan adalah 4, sehingga besar sampel didapatkan dari nilai  $n$  sebagai berikut (Solimun, 2001):

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 5 mencit tiap kelompok perlakuan. Namun, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yamamoto *et al.* pada tahun 2010 mengenai ketahanan mencit terhadap infeksi *Salmonella* Typhimurium, dilaporkan bahwa dalam waktu 12 hari, 9 mencit dari 14 mencit mati (kematian  $\pm$  60%). Oleh sebab itu, pada penelitian ini, jumlah total sampel yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$= 20 \text{ mencit} + (60\% \times 20 \text{ mencit})$$

$$= 25 + 12 \text{ mencit}$$

$$= 32 \text{ mencit}$$

Jadi, mencit yang digunakan sebagai subjek penelitian ini adalah 32 mencit yang dibagi dalam 4 kelompok (8 mencit tiap kelompok).

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Mikrobiologi, Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Instrumentasi jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli sampai Desember 2015.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah kontrol, perlakuan dinding sel *Candida albicans*, dan perlakuan siprofloksasin.

#### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar slgA dan jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada usus halus mencit.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a) Mencit Balb/C yang digunakan berjenis kelamin jantan dan berasal dari PUSVETMA Surabaya.
- b) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium didapat dari biakan murni pada *nutrient agar* yang dibuat di Laboratorium Agrotekno Yogyakarta.
- c) *Candida albicans* yang dipergunakan didapatkan dari biakan fungi yang ditanam pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) selama 24 jam di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d) Dinding sel *Candida albicans* didapat dari proses isolasi dinding sel dan diidentifikasi terdapatnya kandungan  $\beta$ -glucan menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy* (FTIR).
- e) Penghitungan koloni dilakukan secara manual menggunakan *colony counter* terhadap *plate* berisi Bismuth Sulfite Agar (BSA) yang diinokulasi dengan usus mencit yang telah dihaluskan dan disuspensi dalam PBS.
- f) Kadar sIgA diukur menggunakan metode ELISA

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Kultur *Candida albicans*

Untuk membuat kultur *Candida albicans* diperlukan ose, cawan petri, bunsen burner, *Sabouraud Dextrose Agar*, *Candida albicans*, dan inkubator.

##### 4.6.2 Alat dan Bahan Pengambilan Darah dan Pembuatan Serum

Untuk pengambilan serum untuk tes *germ-tube* diperlukan spuit 15 cc, *vacutainer*, EDTA, *torniquet*, alat sentrifus, *falcon*, mikropipet, dan kapas alkohol 70%.

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Tes *Germ-tube*

Dalam tes *germ-tube*, diperlukan serum darah, *microtube*, *plate* berisi kultur, inkubator, *object glass (slide)*, *bunsen burner*, ose, korek api, dan mikroskop binokuler.

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Isolasi Dinding Sel *Candida albicans*

Alat yang digunakan adalah pipet, *blue tip*, neraca analitik, *beaker glass*, labu *Erlenmeyer*, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, alat sentrifus, *filter paper*, dan *microtube*. Bahan yang digunakan adalah *Candida albicans*, larutan NaCl 5%; 2%; 1%, PMSF 1mM, *lysis buffer* (10 mM Tris-HCl dengan pH 7.4 dan 1 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride*).

#### 4.6.5 Alat dan Bahan Pengecekan Pemecahan Sel *Candida albicans*

Alat dan bahan yang digunakan adalah *object glass (slide)*, ose, korek api, *bunsen burner*, pipet, pewarna *methylene blue*, sampel *Candida albicans* hasil proses pelisisan sel, mikroskop binokuler, minyak emersi, spidol, dan akuades.

#### 4.6.6 Alat dan Bahan Ekstraksi $\beta$ -glucan *Candida albicans*

Alat yang diperlukan adalah alat sentrifus, pipet tetes, pipet ukur, mikropipet, dan gelas beker. Bahan yang dibutuhkan antara lain, *Candida albicans*, NaOH 1M, akuades, dan  $H_3PO_4$ .

#### 4.6.7 Alat dan Bahan Identifikasi $\beta$ -glucan Menggunakan FTIR

Alat dan bahan yang diperlukan adalah spatula, mortar, spektrofotometer FTIR, KBr, dan sampel uji  $\beta$ -glucan.

#### 4.6.8 Alat dan Bahan Pembuatan Sediaan $\beta$ -glucan *Candida albicans*

Alat bahan yang digunakan adalah mikropipet, *blue tip*, pelet ekstrak dinding sel *Candida albicans*, PBS, dan *falcon*.

#### 4.6.9 Alat dan Bahan Induksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Alat yang diperlukan adalah kateter 10<sub>FG</sub>, ose, *slide*, *bunsen burner*, mikroskop, spuit 5 cc dan jarum suntik, vacutainer, dan EDTA. Sementara bahan yang diperlukan adalah *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 1 x 10<sup>8</sup> CFU/mL, 10mL antasida, dan *Bismuth Sulfite Agar* dalam cawan petri.

#### 4.6.10 Alat dan Bahan Administrasi $\beta$ -glucan *Candida albicans* pada Mencit

Alat yang dibutuhkan adalah sonde, bahan yang dibutuhkan adalah dinding sel *C. albicans* 100 dengan dosis untuk tiap pemberian sebanyak 100  $\mu$ g/mL.

#### 4.6.11 Alat dan Bahan Administrasi Siprofloksasin pada Mencit

Alat yang dibutuhkan adalah sonde, bahan yang dibutuhkan adalah siprofloksasin dengan dosis setiap pemberian 15 mg/kgBB 2 kali sehari

#### 4.6.12 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit

Pada pemeliharaan mencit diperlukan kandang pemeliharaan mencit, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, dan pakan standar mencit.

#### 4.6.13 Alat dan Bahan Pembedahan

Alat dan bahan yang digunakan adalah gunting, pinset, jarum pentul, meja bedah, kapas, toples, kloroform, alkohol, *icebox*, *vial*, formalin, dan *aluminium foil*.

#### 4.6.14 Alat dan Bahan Pengukuran sIgA Metode ELISA

Alat yang digunakan adalah ELISA reader 450 nm, well plate, sentrifus, pipet, *blue tip*, dan mikrotube. Bahan yang digunakan adalah

sekret usus halus hewan coba, PBS, PBS-Tween-20, sodium azide, dan kit deteksi IgA ELISA.

#### 4.6.15 Alat dan Bahan Kultur Usus Halus Mencit

Alat yang digunakan adalah alat sentrifus, *petri dish*, mikropipet, pipet tetes, gunting bedah, dan *microtube*. Bahan yang digunakan adalah PBS, PMSF, akuades, dan usus halus mencit.

#### 4.6.16 Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi

Alat yang digunakan adalah tempat cuci tangan, jas laboratorium, masker, handscoen, alkohol 70%, kapas, dan sabun antiseptik.

### 4.7 Metode Pengumpulan Data

#### 4.7.1 Prosedur Pembuatan Kultur *Candida albicans*

*Sabouraud Dextrose Agar* merupakan salah satu agar yang mendukung pertumbuhan jamur (Saigal *et al*, 2011). Agar yang sudah berada dalam cawan petri kemudian dilapisi dengan koloni *Candida albicans* menggunakan ose. Cawan petri kemudian diletakkan dalam inkubator 37°C selama 24 jam.

#### 4.7.2 Prosedur Tes *Germ-tube*

Prosedur ini dilakukan untuk memverifikasi jamur yang tumbuh dalam media kultur *Sabouraud Dextrose Agar* memang benar-benar *Candida albicans*. Pertama-tama, serum dimasukkan dalam *microtube* kemudian ditambahkan sedikit sampel dari kultur *Candida albicans* ke dalamnya. Setelah itu dilakukan inkubasi dengan dimasukkan pada alat inkubator selama 90 menit pada suhu 37°C dan setelah dikeluarkan, hasilnya diletakkan pada *object glass* menggunakan ose, kemudian diamati di bawah mikroskop binokuler (Saigal *et al.*, 2011).

#### 4.7.3 Prosedur Isolasi Dinding Sel *Candida albicans*

*Candida albicans* dipanen di ruang *Laminar Air Flow* kemudian dikumpulkan dengan sentrifugasi yang kemudian dilanjutkan dengan filtrasi dan dicuci dengan *lysis buffer* 5 kali. Setelah itu, sel diresuspensi dengan dilakukan sentrifugasi 3000 g selama 10 menit kemudian hasil sentrifugasi ini disuspensi dalam *lysis buffer* dengan suhu 0°C dan kemudian dilisiskan secara mekanis dengan *glass bead* dengan volume yang setara dalam *homogenizer*. Prosedur ini dilakukan sampai terjadi pemecahan sel secara sempurna, yang kemudian diverifikasi dengan tes gram. Sel yang telah mengalami lisis kemudian diseparasi dengan sentrifugasi pada 3000 g selama 10 menit, yang kemudian menghasilkan fraksi dinding sel (pelet) dan fraksi sitoplasma larut (supernatan). Pelet inilah yang diambil (Pitarch *et al.*, 2002).

#### 4.7.4 Prosedur Pengecekan Pemecahan Sel *Candida albicans*

Pengecekan pemecahan sel *Candida albicans* dilakukan dengan pembuatan hapusan di atas gelas objek yang diwarnai dengan pewarnaan Gram (Bzducha *et al.*, 2014). Hapusan kemudian diamati pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi.

#### 4.7.5 Prosedur Ekstraksi $\beta$ -glucan *Candida albicans*

Dinding sel *Candida albicans* terlebih dahulu disiapkan dengan cara dicuci menggunakan akuades sebanyak tiga kali, kemudian dilakukan perendaman dengan NaOH 1 M pada suhu 90°C selama 2 jam (isolasi basa). Kemudian, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 10 menit dan pencucian dengan akuades selama tiga kali. Lalu, dilakukan perendaman dinding sel dengan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 4% pada suhu ruang

selama dua jam (isolasi asam), kemudian dilakukan sentrifugasi kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 10 menit dan pencucian dengan akuades sebanyak tiga kali. Sedimen basah selanjutnya dikeringkan dengan cara mencucinya dengan etanol. Lalu, dilakukan filtrasi dengan vakum yang dipasang pada corong Buchner. Lalu, sedimen diletakkan pada cawan petri dan dikeringkan pada suhu ruang (Krpan *et al.*, 2010).

#### 4.7.6 Prosedur Penyiapan $\beta$ -glucan *Candida albicans* untuk Perlakuan

Ditimbang *falcon* kosong, kemudian ditambahkan  $\beta$ -glucan *Candida albicans* dan ditimbang kembali. Setelah itu, dengan mikropipet ditambahkan PBS untuk melarutkan  $\beta$ -glucan dalam *falcon* (Qi *et al.*, 2011). Larutan ini kemudian dibuat hingga mencapai konsentrasi 1,5 mg/mL.

#### 4.7.7 Prosedur Identifikasi $\beta$ -glucan dengan FTIR

Disiapkan KBr 0,075 g dan sampel 0,0087 g dan dicampur hingga merata dengan menggunakan mortar. Campuran yang telah homogen diberi tekanan dengan *hand press* sampai konsistensinya cukup tipis untuk dilakukan pengukuran. Campuran yang telah siap dimasukkan pada *sample holder* FTIR untuk diukur dan dibuat spektra FTIR-nya.

#### 4.7.8 Prosedur Infeksi *Salmonella* Typhimurium pada Mencit

Mencit diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium ( $10^8$  sel/mL) sejumlah 300  $\mu$ L *per oral* 2 kali dalam interval 2 hari (Winarsih, 2005).

#### 4.7.9 Prosedur Administrasi $\beta$ -glucan *Candida albicans* pada Mencit

Ekstrak dinding sel *Candida albicans* yang mengandung  $\beta$ -glucan diberikan ke mencit dengan dosis 100  $\mu$ g/mL *per oral* menggunakan sonde (Pullinger *et al.*, 2010).

#### 4.7.10 Prosedur Pemberian Terapi Siprofloksasin pada Mencit

Pada hari ke-2 setelah infeksi mencit diberi dosis 15 mg/kgBB 2dd1 siprofloksasin *per oral* sejak hari ke-5 setelah infeksi hingga hari ke-9 setelah infeksi (Endt *et al.*, 2012).

#### 4.7.11 Prosedur Pemeliharaan Mencit

Mencit dipelihara dalam kandang dengan ukuran yang cukup besar untuk mencegah terjadinya agresi dan kegelisahan mencit. Satu kandang berisi 6-8 mencit. Mencit diberi makan dan diberi minum sekali sehari. Area kandang didesain agar mencit mampu memenuhi kebutuhan fisiologis dasarnya (Fawcett, 2012). Mencit akan mengalami masa aklimatisasi selama 1 minggu sebelum diberikan perlakuan. Perlakuan yang diberikan disesuaikan untuk kelompok-kelompok mencit. Perlakuan-perlakuan pada mencit antara lain adalah induksi dengan *Salmonella* Typhimurium, pemberian dinding sel *Candida albicans*, dan pemberian siprofloksasin. Perlakuan diberikan dengan rute *per oral*.

#### 4.7.12 Prosedur Pembedahan Mencit

Mencit yang telah dibius dengan kloroform kemudian diletakkan pada meja bedah, dengan lengan dan kakinya direntangkan, kemudian ditahan dengan jarum pentul. Perut mencit lalu dibuka dengan gunting dan pinset dengan insisi dari anus sampai dagu (Parkinson *et al.*, 2011). Usus halus kemudian diambil dan dimasukkan dalam *aluminium foil*, setelah itu dimasukkan dalam *ice box*. Setelah mencit dikorbankan, mencit akan dikuburkan.

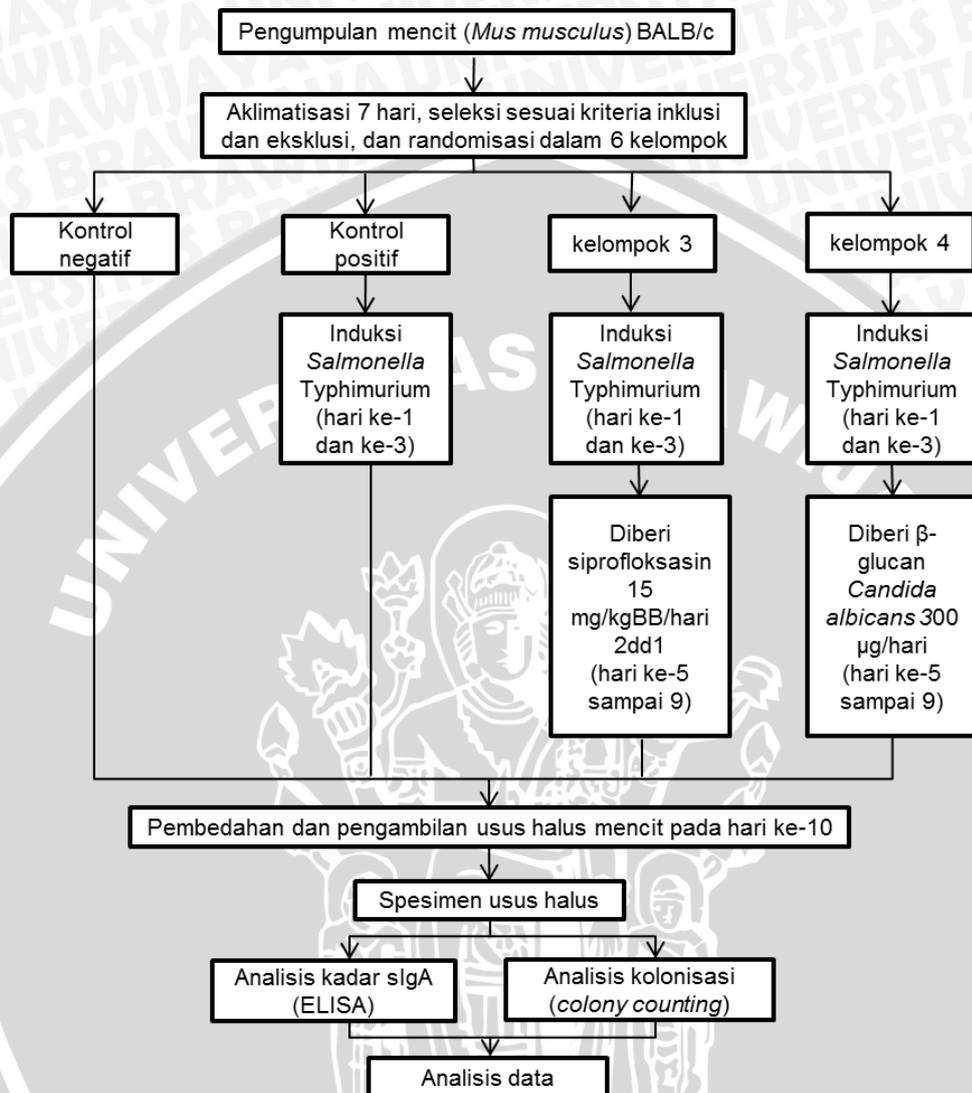
#### 4.7.13 Prosedur Pengukuran Kadar sIgA (ELISA)

Usus halus mencit dipotong longitudinal hingga lumen terbuka, kemudian permukaan usus tersebut *discrapping* dan dicuci dengan 2 mL PBS yang mengandung 1 mM PMSF. Kemudian, cairan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1000 g selama 5 menit untuk memisahkan debris. Selanjutnya, supernatan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7000 g selama 5 menit untuk menghilangkan debris. Supernatan diambil dan disimpan untuk diukur sIgA dengan metode ELISA indirek pada *well* yang sudah dilapisi dengan antigen *whole cell Salmonella Typhimurium*. Antigen yang terlapisi pada permukaan sumuran selanjutnya direaksikan dengan antibodi primer yaitu IgA, kemudian kompleks antigen-antibodi primer direaksikan dengan antiglobulin sekunder anti-IgA berlabel biotin-HRP. Lalu, ditambahkan substrat TMB, dan reaksi dihentikan setelah waktu reaksi optimum tercapai dengan menambahkan larutan asam sulfur. Terakhir, hasil akan diukur dengan ELISA reader pada  $\lambda = 450 \text{ nm}$  (Michetti *et al.*, 1992). Antigen *whole cell Salmonella Typhimurium* dibuat dengan cara sonikasi 20 khz selama 3 menit tiap kali sonikasi sebanyak 10 kali.

#### 4.7.14 Prosedur Kultur Usus Halus Mencit

Usus halus mencit dihomogenasi dan ditanam pada medium BSA, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam (Mc Cormick *et al.*, 1988). Setelah itu, akan dilakukan penghitungan jumlah koloni pada medium tersebut menggunakan *colony counter*.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Data yang didapat berupa kadar sIgA dan jumlah koloni bakteri dari usus halus mencit yang akan diinterpretasi dengan uji hipotesis *one-way* ANOVA jika data yang diperoleh normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Jika data tidak normal dan/atau tidak homogen, maka data akan ditransformasi dengan harapan sebaran data menjadi normal dan homogen sehingga dapat diuji dengan *one-way* ANOVA. Jika sebaran data tetap tidak normal dan/atau tidak homogen,

maka dilakukan uji hipotesis non parametrik Kruskal Wallis. Setelah uji hipotesis dengan *one-way* ANOVA atau Kruskal Wallis selesai dilakukan, maka dilakukan uji *post hoc* dengan metode Tukey HSD untuk *one-way* ANOVA dan Mann-Whitney untuk Kruskal Wallis agar diketahui kelompok data yang memberikan perbedaan signifikan.

