

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini adalah *true experimental study* dengan menggunakan *post test only group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan tujuan untuk mengetahui efek pemberian vaksin kinoid IL-17A terhadap kerentanan infeksi. Subjek penelitian menggunakan hewan coba mencit Balb/c betina model LES yang diberi vaksin kinoid IL-17A kemudian di injeksi MRSA.

Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan, adapun tabelnya adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Mencit Model LES dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol	Mencit model LES
P1	Mencit model LES + bakteri MRSA
P2	Mencit model LES + bakteri MRSA + vaksin kinoid IL-17A 50 μ g

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit strain Balb/c betina model LES. Mencit model LES diberi vaksin kinoid IL-17A kemudian injeksi MRSA dan dilakukan pembedahan pada akhir perlakuan untuk menilai kerentanan infeksi melalui jumlah kolonisasi bakteri. Seluruh mencit yang akan dijadikan subjek penelitian tersebut terlebih dahulu telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Kriteria Inklusi Sampel Penelitian

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit balb/c model LES yang merupakan subjek pada penelitian ini :

1. Mencit strain Balb/c betina model LES
2. Mencit mendapatkan hasil positif pada test ANA

4.2.2 Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian

Berikut ini adalah kriteria eksklusi subjek penelitian

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
2. Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel mencit yang digunakan dalam penelitian ini dibagi berdasarkan tahap penelitian. Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian ini dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan:

n : jumlah ulangan

p : jumlah perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 3 perlakuan seperti yang disebutkan diatas.

Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$n \geq 7,5$$

Menurut perhitungan, besar sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 8 ekor. Sampel mencit total yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 24 ekor mencit Balb/c model LES.

4.3 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk memberikan perlakuan pada mencit, pembuatan vaksin kinoid IL-17A di Laboratorium Biomedik FKUB dan Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk perhitungan kolonisasi bakteri.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian vaksin kinoid IL-17A dosis 50 μ g.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah kolonisasi bakteri pada organ ginjal.

4.4.3 Variabel Perancu

Variabel perancu dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat mengakibatkan perancu atas variabel tergantung yang dihasilkan seperti suhu ruangan, dan kelembapan kandang.

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba model lupus adalah mencit balb/c sesuai kriteria inklusi dan eksklusi yang telah positif tes ANA dan mempunyai manifestasi klinis.

2. Vaksin kinoid IL17A adalah protein recombinant IL-17A yang dikonjugasikan dengan *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) sehingga terbentuk vaksin yang secara alamiah membentuk antibodi anti IL-17A. Dengan dosis pemberian 50µg secara intramuskular.
3. MRSA atau *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang akan diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/ml kemudian dilakukan pembedahan pada organ ginjal mencit LES.
4. Kulturasasi organ ginjal dengan menggunakan metode *pour plate* pada media *chrome agar plate*.
5. Perhitungan jumlah kolonisasi bakteri pada organ ginjal dengan menggunakan *colony counter* untuk menilai kerentanan tubuh terhadap infeksi setelah dilakukan vaksinasi.

5.6 Bahan dan Alat /Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat yang digunakan

- Spuit 1cc
- Falcon
- Inkubator
- Tabung sentrifus
- Sentrifugator
- *Colony counter*
- Medium Chrom Agar Plate
- Gunting lurus
- Pin/Jarum

- Papan bedah

4.6.2 Bahan yang digunakan

- Recombinant mouse IL-17A
- Bakteri MRSA 10^8 cfu/ml
- Organ ginjal mencit LES
- Alkohol 70%
- NaCl 0,9%
- *Glutaraldehyde*
- *keyhole limpet hemocyanin* (KLH)
- *Complete freud's adjuvant* (CFA)
- *Incomplete freud's adjuvant* (IFA)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/c model LES yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu mencit diadaptasikan di dalam kandang Laboratorium selama tujuh hari dengan diberi makan dan dirawat setiap harinya. Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pembuatan Vaksin Kinoid IL-17A

Kinoid yang digunakan sebagai bahan vaksin dalam penelitian ini adalah sitokin IL-17A. IL-17A yang digunakan merupakan *recombinant mouse IL-17A* (mIL-17A) *cytokine*. Sitokin rekombinan diperoleh dari pabrik yang sudah

tersertifikasi dan terjamin kemurniannya. Sitokin tersebut kemudian dilakukan konjugasi terlebih dahulu dengan protein karier *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) untuk meningkatkan imunogenisitas dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksin kinoid. Proses kompleksisasi dengan KLH dilakukan menggunakan metode pemberian aldehyde seperti yang telah dilakukan sebelumnya oleh Zagury, *et al.*(2009), secara singkat metodenya adalah sebagai berikut. KLH dan IL-17A dilarutkan bersama ke dalam PBS. Larutan mL-17A dan KLH tersebut kemudian dilarutkan dengan glutaraldehyde (22,5 mM) dengan rasio 1:40. Glutaldehyde yang berlebih dibuang dengan cara dialisis dengan PBS. Setelah itu campuran didinginkan dengan glisin dan dilanjutkan dialisis kembali dengan PBS. Kinoid kemudian disimpan dalam suhu 4°C (Zagury, *et al.*, 2009).

4.7.3 Prosedur Vaksinasi

Dosis kinoid mL-17A yang diberikan adalah sebanyak 50 µg berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Rohn, *et al* (2006) mengenai pemberian vaksin IL-17 terhadap artritis dan ensefalomyelitis. Vaksin kemudian dicampurkan dengan adjuvan untuk meningkatkan respon antibodi yang terbentuk terhadap antigen. Adapun adjuvan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *complete freud's adjuvant* (CFA) dan *incomplete freud's adjuvant* (IFA) (Rohn, *et al.*, 2006). Larutan vaksin kinoid IL-17A tersebut dicampurkan dengan adjuvan dengan perbandingan 1:1. Campuran vaksin dengan CFA dilakukan pada injeksi primer atau injeksi pertama sedangkan untuk booster selanjutnya akan dilakukan dengan penambahan adjuvan IFA. Larutan vaksin dan adjuvan diinjeksikan secara intramuskuler pada mencit sebanyak tiga kali dengan jarak

pemberian masing-masing selama tiga minggu dan dengan dosis vaksin kinoid IL-17A 50µg (hari ke-0, 21, dan 42).

4.7.4 Prosedur Injeksi MRSA pada Mencit

MRSA atau *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/ml. Kemudian dilanjutkan dengan inkubasi selama tujuh hari.

4.7.5 Prosedur Pembedahan pada Mencit

Setelah proses inkubasi selesai dilakukan pembedahan untuk mengambil organ ginjal pada mencit. Proses euthanasia pada mencit terlebih dahulu dilakukan dengan inhalasi gas eter sebelum pembedahan dilakukan. Mencit euthanasia kemudian mencit diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan jarum atau pin, setelah terfiksasi dengan baik pembedahan dilakukan dengan menggunakan gunting dimulai dari bagian perut. Organ ginjal diambil dan dipisahkan dari lemak yang menempel disekitarnya. Organ ginjal kemudian di masukkan kedalam falcon yang berisi aquades agar steril untuk kemudian dilakukan proses kultur.

4.7.6 Prosedur Kultur Organ Ginjal

Metode yang digunakan untuk kulturisasi organ ginjal mencit adalah metode *pour plate*. Metode ini merupakan suatu teknik menumbuhkan mikroorganisme didalam media agar dengan cara mencampurkan media agar yang masih cair dengan organ ginjal yang telah dihancurkan sehingga bakteri dapat tersebar merata dengan baik dipermukaan agar atau didalam agar

(Ragunathan, 2015). Metode ini digunakan untuk jenis sampel padat seperti organ ginjal yang tidak dapat difiltrasi dan sulit untuk diratakan dipermukaan agar. Dalam metode ini dilakukan pengenceran pada organ ginjal mencit dan NaCl 0,9% dengan perbandingan 1:9. Hasil pengenceran yang telah divortex kemudian dicampurkan dengan media *chrome agar plate* cair. Teknik kultur dengan media *chrome agar plate* merupakan selektif medium agar untuk bakteri MRSA (Francois, 2008). Media agar yang telah membeku kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37 derajat celsius, sehingga akan terbentuk koloni pada media *chrome agar plate*, kemudian diamati dengan menggunakan *colony counter*.

4.8. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Data diperoleh akhir penelitian paska dilakukan kultur pada organ ginjal mencit. Kemudian dilakukan proses perhitungan koloni bakteri menggunakan *colony counter*. Keseluruhan data yang diperoleh akan dibandingkan tiap kelompok. Uji perbandingan dilakukan dengan *one way ANOVA* apabila sebaran data normal serta varian data sama ($p < 0,05$) dan kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk menentukan perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok. Perbedaan yang ada pada tiap kelompok dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$.