

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental study* dengan menggunakan *post test only group design*. Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efek pemberian vaksin kinoid IL-17 terhadap resistensi bakteri MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) pada mencit pasca LES ini dilakukan secara *in vivo*. Subjek penelitian menggunakan hewan coba mencit Balb/c model LES diinduksi pristane yang diberi vaksin kinoid IL-17A dan sebagai kontrol adalah hewan coba model LES diinduksi pristane yang tidak diberi vaksin kinoid IL-17A.

Subjek penelitian terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan, antara lain kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) dan kelompok perlakuan 4 (P4). Rinciannya adalah sebagai berikut :

- P1 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL-17A 50µg, dan dengan pemberian bakteri MRSA.
- P2 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL-17A 50µg, dan tanpa pemberian bakteri MRSA.
- P3 : Hewan coba induksi lupus, tanpa pemberian vaksin kinoid IL-17A, dan dengan pemberian bakteri MRSA.
- P4 : Hewan coba induksi lupus, tanpa pemberian vaksin kinoid IL17A, dan tanpa pemberian bakteri MRSA.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah mencit *strain* Balb/c yang diperoleh dari LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah tersertifikasi. Mencit yang telah terinduksi lupus dengan penyuntikan pristane kemudian diinjeksikan vaksin kemudian dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai beberapa variabel. Seluruh mencit yang akan dijadikan subjek penelitian tersebut terlebih dahulu telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Pemilihan Sampel

4.2.1.1 Kriteria Inklusi Sampel Penelitian

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit subjek penelitian ini :

1. Mencit yang diinduksi lupus dengan penyuntikan pristane.
2. Mencit *strain* Balb/c betina dengan tingkah laku normal.
3. Mencit yang telah dilakukan tes ANA (+) serta menunjukkan 4 dari 11 kriteria lupus.
4. Berat badan rata-rata 25-30 gram.

4.2.1.2 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.

4.2.2 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel mencit yang dibutuhkan untuk penelitian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

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

t : jumlah perlakuan dalam kelompok

n : jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

Pada penelitian tahap kedua, terdapat lima perlakuan seperti yang disebutkan diatas. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(4 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Untuk empat perlakuan, diperlukan pengulangan minimal enam kali untuk tiap perlakuan sehingga total sampel mencit yang diperlukan dalam penelitian ini adalah minimal 24 ekor mencit Balb/c model LES.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Mei tahun 2015 hingga Januari 2016.

4.3.2 Tempat Penelitian

Laboratorium farmakologi, laboratorium biomedik dan laboratorium mikrobiologi FKUB.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian vaksin kinoid IL-17A 50µg secara intramuskular kepada mencit Balb/c model lupus.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian adalah jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru.

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba model lupus adalah mencit balb/c sesuai kriteria. Kriteria tersebut antara lain tes ANA yang dilakukan pada mencit model lupus (+). Ditemukan gejala klinis lupus pada hewan coba berupa *malar rash*, *arthritis*, *ascites*.
2. Vaksin kinoid IL-17A adalah protein *recombinant* IL-17A yang dikonjugasikan dengan *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) sebagai *carrier*, dengan metode pemberian *glutaraldehyde* seperti yang telah dilakukan sebelumnya oleh Zagury, *et al.*(2009) dengan dosis pemberian 50µg.
3. MRSA atau *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang akan diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10⁸.
4. *Colony Forming Units* adalah satuan dari penghitungan jumlah kolonisasi bakteri yang dilakukan dengan menggunakan alat *colony counter electronic*

4.6 Alat dan bahan

4.6.1 Alat

Sprit 1cc

Beaker glass

Inkubator

Tabung sentrifus

Petri dish

Colony counter

Kantong selovan cat off 10 kDa

Falcon

Papan bedah

Gunting lurus untuk pembedahan

Pin

Medium *chrome agar plate*

4.6.2 Bahan

Aquades

Organ paru mencit

Bakteri MRSA 10^8 cfu/ml

Eter

Recombinant mouse IL 17-A

Purified anti mouse IL 17-A antibody

Biotin goat anti mouse IgG antibody

ELISA coating buffer

96 uncoatingwell plate



FITC anti-mouse CD4

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)

ELISA Kit anti-dsDNA mouse

NF- κ B p65 antibody mouse

Starr Trek Universal HRP Detection

ELISA Kit mouse IL-17A

NaBH₄ 20 mg

APW

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit *strain* Balb/c yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit Balb/c ini dipilih dengan alasan terkumpulnya data dari penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/c dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Mencit yang terpilih adalah mencit yang telah diinjeksikan pristane sesuai dengan prosedur yang telah dideskripsikan pada penelitian-penelitian sebelumnya sebanyak 0.5 ml secara intraperitoneal dan muncul gejala klinis lupus serta tes ANA (+). Mencit diberikan makanan dan ditempatkan dalam kandang yang dibersihkan setiap harinya. Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pembuatan Bahan Vaksin Kinoid

Dalam penelitian ini, digunakan sitokin IL-17A yaitu IL-17A yang merupakan *recombinant mouse IL-17A* (mIL-17A) *cytokine* sebagai bahan vaksin. Sitokin rekombinan tersebut diperoleh dari pabrik dan sudah tersertifikasi serta terjamin kemurniannya. Sitokin yang diperoleh kemudian dikonjugasikan terlebih dahulu dengan protein karier *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) untuk meningkatkan efek imunogenisitas dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksin kinoid. Proses konjugasi 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 mIL-17A dilarutkan ke dalam PBS, kemudian dilarutkan dengan *glutaraldehyde* (22,5 mM) dalam rasio 1:40. Kemudian dilakukan dialisis dengan PBS untuk membuang *glutaraldehyde* yang berlebih. 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 Imunisasi Vaksin Kinoid pada Mencit

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Rohn, *et al* (2006) mengenai pemberian vaksin IL-17 terhadap artritis dan ensefalomyelitis, dosis kinoid mIL-17A diberikan dalam dosis sebanyak 50 µg. Vaksin kemudian dicampurkan dengan *adjuvant* dengan konsentrasi 1 : 1 (v/v) untuk meningkatkan respon antibodi yang terbentuk terhadap antigen. *Adjuvant* yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari *complete freud's adjuvant* (CFA) dan *incomplete freud's adjuvant* (IFA) (Rohn, *et al.*, 2006). Saat dilakukan injeksi pertama, vaksin dicampur dengan CFA. Sedangkan booster selanjutnya, vaksin

dikonjugasikan dengan *adjuvant IFA*. Campuran larutan vaksin dan *adjuvant* diinjeksikan secara intramuskuler pada mencit. Mencit kemudian diinjeksikan MRSA sebelum dilakukan pembedahan.

4.7.4 Prosedur Injeksi MRSA

MRSA atau *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* diinjeksikan ke dalam hewan coba secara intraperitoneal. Teknik injeksi secara peritoneal umumnya dilakukan di laboratorium, pada hewan coba seperti tikus dan mamalia kecil lainnya (Turner, *et al.*, 2011). Injeksi secara intraperitoneal dapat langsung melewati diafragma melalui lakuna kecil menuju kelenjar getah bening pada daerah thoraks (Abu-Hijleh, *et al.*, 1995).

Dosis yang diberikan untuk injeksi MRSA adalah sebanyak 10^8 cfu/ml. Kemudian dilakukan inkubasi selama 7 hari.

4.7.5 Prosedur Pembedahan

Pembedahan dilakukan setelah *euthanasia* dengan inhalasi eter. Mencit diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin. Agar memudahkan tahap pembedahan, tubuh mencit dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan. Pembedahan dimulai dari bagian perut dengan menggunakan gunting bengkok. Dilakukan pengambilan organ paru dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus. Organ dimasukkan dalam *falcon* yang berisi aquades.

4.7.6 Prosedur Kultur

Organ yang telah diambil kemudian diletakkan ke NaCl 0.9% .Setelah itu dilakukan penimbangan organ. Kemudian dicampurkan dengan APW (*Alkaline Pepton Water*) untuk dibuat seri pengenceran. Sampel organ dihomogenkan dengan APW , dilakukan hingga 4 kali. Dilakukan pembiakan pada medium *Chrome Agar Plate* selama 7 hari kemudian diinkubasi dalam waktu 2x 24 jam.

4.7.7 Prosedur Penghitungan Kolonisasi Bakteri

Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan penghitungan kolonisasi bakteri dengan menggunakan *colony counter electronic*. Alat ini membantu memudahkan penghitungan kolonisasi bakteri. Penggunaan alat ini yaitu dengan cara menandai koloni dengan *pen* yang terhubung dengan *counter*. Kemudian dicatat hasil yang telah diperoleh.

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diambil berupa data-data hasil jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru. Data- data tersebut diambil setelah dilakukan penghitungan kolonisasi bakteri dengan *colony counter*. Apabila sebaran data normal serta varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *One-Way ANOVA*. Namun, apabila tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Kemudian, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One-Way ANOVA* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dianggap bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$.

4.9 Alur penelitian

