

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 IL17 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 IL17A dan sebagai kontrol adalah hewan coba model LES diinduksi pristane yang tidak diberi vaksin kinoid IL17A.

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

- P1 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL17A 50 μ g, dan dengan pemberian bakteri MRSA
- P2 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL17A 50 μ g, dan tanpa pemberian bakteri MRSA
- P3 : Hewan coba induksi lupus, tanpa pemberian vaksin kinoid IL17A, 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 bersertifikasi. Mencit yang telah terinduksi lupus kemudian diinjeksikan vaksin kemudian dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai beberapa variabel. 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 subjek penelitian ini :

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

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 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 empat 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 betina model LES.

4.3 Tempat dan waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Laboratorium Farmakologi, laboratorium Biomedik dan laboratorium Mikrobiologi FKUB

4.3.2 Waktu Penelitian

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

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 darah mencit

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba model lupus adalah mencit Balb/c sesuai kriteria. Kriteria tersebut antara lain tes ANA yang positif pada mencit. Ditemukan gejala klinis lupus pada hewan coba berupa *malar rash*, *arthritis*, *ascites*.
2. Vaksin kinoid IL17A 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 didapat dari luar yang akan diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/ml.
4. Penghitungan jumlah kolonisasi bakteri atau *Colony Forming Units* (CFUs) *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* pada darah mencit yang telah dikultur dilakukan dengan menggunakan *colony counter electronic* yaitu dengan cara menandai koloni dengan pen yang terhubung dengan counter.

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
Darah 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-kB p65 antibody mouse
Starr Trek Universal HRP Detection
ELISA Kit mouse IL-17A

NaBH₄ 20 mg

APW (Alkaline Peptone Water)

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 mL-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 mL- 17A diberikan dalam dosis sebanyak 50 µg. Vaksin kemudian dicampurkan dengan adjuvan dengan konsentrasi 1 : 1 (v/v) untuk meningkatkan respon antibodi yang terbentuk terhadap antigen. Adjuvan 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 adjuvan 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 kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/ml dan kemudia 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

Darah diambil dari jantung mencit sebanyak 0,5 ml kemudian diletakkan ke dalam vacutainer berisi *lithium heparin*. Darah ditambahkan NACL 0,9% kemudian di biakkan pada medium untuk MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) yaitu menggunakan *Chrome Agar Plate* kemudian diinkubasi dalam inkubator bersuhu konstan 35°C dalam waktu 24 jam dan dilihat apakah ada bakteri yang berkembang.

4.7.7 Prosedur Penghitungan Jumlah Bakteremia

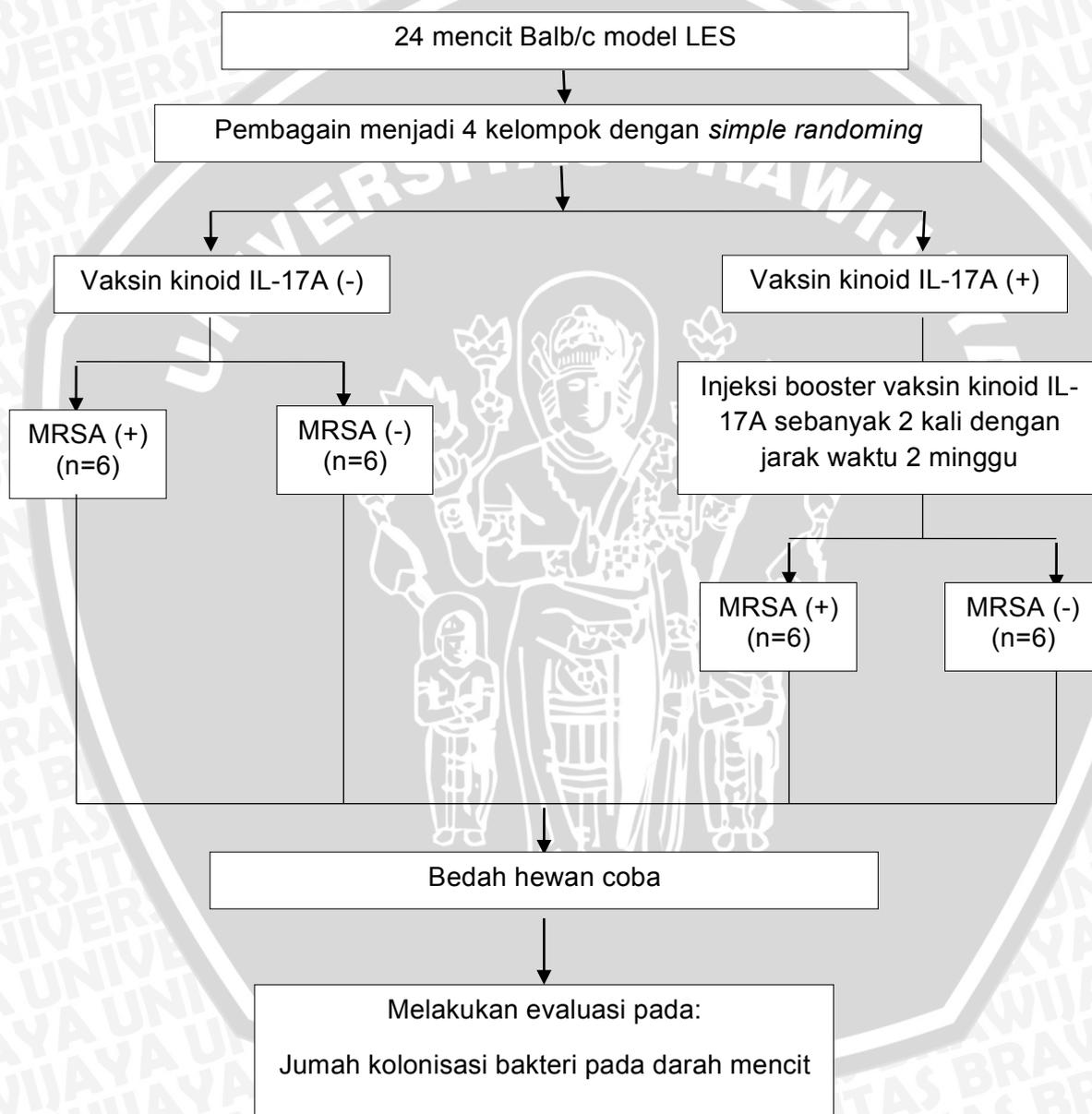
Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan penghitungan kolonisasi bakteri dengan menggunakan *colony counter electronic*. Alat ini membantu memudahkan penghitungan kolonisasi bakteri. Penggunaan alat ini yaitu dengan cara menandai koloni dengan *pen* yang terhubung dengan *counter*. Kemudian dicatat hasil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



Gambar 4.1 Alur Penelitian