

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan jenis penelitiannya *The Randomized pretest - posttest* secara *in vivo* yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium RSUD. Dr. Iskak Tulungagung. Terdapat empat kelompok eksperimental yang diberi terapi, dan seluruh kelompok diawali dengan pengukuran awal (*pretest*), setelah pemberian terapi juga dilakukan pengukuran kembali (*posttest*). Subjek yang dipilih dalam rancangan penelitian ini menggunakan *Randomized* atau tehnik acak.

Perlakuan dalam penelitian ini dilakukan pada wanita usia subur dengan *bacterial vaginosis* (BV) yang diberi terapi metronidazole secara oral, *Glucomannan Hydrolysates* (GMH), dan *Balance Aktif* secara *suppositoria* pervaginam. Sedangkan fenomena yang terjadi akibat adanya terapi pada penelitian ini adalah kadar slg A, β -defensins dan Jumlah Koloni Bakteri *Lactobacillus spp.*

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu pasien BV dengan kriteria tertentu. Besar sampel penelitian yaitu penghitungan besarnya pengulangan pemeriksaan ditentukan berdasarkan rumus :

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

t = Jumlah Perlakuan

r = Jumlah Pengulangan

(Hanafiah, 2011)

Pada penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan, sehingga sampel yang diperlukan adalah :

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

$$3(r-1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 18 : 3$$

$$r \geq 6 \text{ orang sampel/ kelompok}$$

Jumlah sampel secara keseluruhan yaitu $6 \times 4 = 24$ orang pasien (sampel), dimana 4 adalah jumlah kelompok yang diberikan terapi, sedangkan untuk cadangan dalam penelitian adalah 1 pasien pada setiap kelompok. Sehingga jumlah keseluruhan pasien yang digunakan dalam penelitian ini adalah 28 orang pasien.

Pengambilan sampel sesuai dengan syarat kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

a. Kriteria inklusi

1. Wanita usia 20 – 49 tahun.
2. Wanita yang telah menikah atau sudah pernah berhubungan seksual.
3. Wanita dengan siklus menstruasi yang teratur.
4. Wanita dengan hasil gram (+) vaginosis.
5. Wanita dengan riwayat pasangan seksual tetap.
6. Wanita dengan pH vagina basa (> 4.5).
7. Wanita dengan adanya "*clue cells*" pada pengujian dibawah mikroskop dari sampel yang diambil dari vagina (*swab*).
8. Wanita dengan bau "*fishy*" yang makin tajam setelah penambahan 10% KOH (pelepasan amina) pada sampel cairan vagina.
9. Wanita yang bersedia menjadi responden penelitian.
10. Wanita dengan persetujuan pasangan (suami).

b. Kriteria eksklusi

1. Wanita yang sedang menstruasi, hamil atau menyusui.
2. Wanita menggunakan produk probiotik atau prebiotik di luar rancangan penelitian.
3. Wanita dengan penggunaan antibiotik jenis apapun untuk pengobatan penyakit lainnya.
4. Wanita dengan kontrasepsi hormonal (suntik, pil, implant).
5. Wanita dengan penyakit sistemik akut (*Diabetes Mellitus*).
6. Wanita dengan *Immuno-compromise* dan penyakit yang berhubungan dengan sistem imunitas tubuh (HIV/ AIDS, SLE).

4.2.2 Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 7 Pasien antara lain :

a. Kelompok 1 pemberian terapi Metronidazole

Pasien diberikan Metronidazole diminum dengan dosis 500 mg, 2 x sehari selama 7 hari. Profil mikrobiologi vagina diuji pada hari ke-0 (sebelum terapi antibiotik), hari ke-11 (setelah terapi antibiotik) dan hari ke-22 (setelah terapi antibiotik).

b. Kelompok 2 pemberian terapi Metronidazole+GMH

Pasien diberikan Metronidazole diminum dengan dosis 500 mg, 2 x sehari selama 7 hari dan juga diberikan terapi *pessary* yang mengandung 300 mg GMH dimasukkan kedalam lubang vagina, pasien diberikan *pessary* 3 kali seminggu dan dianjurkan digunakan sebelum tidur selama 21 hari. Profil mikrobiologi vagina diuji pada hari ke-0 (sebelum terapi *pessary*), hari ke-11 (setelah terapi *pessary*) dan hari ke-22 (setelah terapi *pessary*).

c. Kelompok 3 pemberian terapi *Balance Aktiv*

Pasien diberikan terapi *Balance Aktiv* digunakan sesuai petunjuk pabrik pembuatnya, sekali sehari selama 7 hari. Profil mikrobiologi vagina diuji pada

hari ke-0 (sebelum terapi *Balance Aktiv*), hari ke-11 (pemberian terapi *Balance Aktiv*) dan hari ke-22 (pemberian terapi *Balance Aktiv*)

d. Kelompok 4 pemberian terapi GMH+*Balance Aktiv*

Pasien diberikan terapi *pessary* yang mengandung 300 mg GMH 3 kali seminggu dan dianjurkan digunakan sebelum tidur selama 21 hari serta diberikan terapi *Balance Aktif* digunakan sesuai petunjuk pabrik pembuatnya, sekali sehari selama 7 hari, dimasukkan kedalam lubang vagina. Profil mikrobiologi vagina diuji pada hari ke-0 (sebelum terapi *Balance Aktiv & pessary*), hari ke-11 (pemberian terapi *Balance Aktiv & pessary*) dan hari ke-22 (pemberian terapi *Balance Aktiv & pessary*).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel adalah suatu atribut atau sifat yang dimiliki oleh obyek dan memiliki variasi tertentu untuk diterapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2012)

a. Variabel tergantung (*dependent*)

Variabel *dependent* dalam penelitian ini yaitu kadar slg A, β -*defensins* dan Koloni Bakteri *Lactobacillus spp.*

b. Variabel bebas (*independent*)

Variabel *independent* dalam penelitian ini adalah GMH dan *Balance Aktif*

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

- a. Poli Kandungan RSUD Dr. Iskak Tulungagung sebagai tempat pengambilan sampel.
- b. Laboratorium RSUD Dr. Iskak Tulungagung sebagai tempat pemeriksaan *Nugent Score* untuk *Bacterial Vaginosis*.

- c. Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeriksaan *Nuggent Score* untuk *Bacterial Vaginosis* dan pemeriksaan koloni bakteri.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari s.d Agustus tahun 2017

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- a. Sampel *secret* vagina wanita dengan BV pada H0 sebelum diberikan terapi GMH dan *Balance Aktif*.
- b. Sampel *secret* vagina dengan BV pada H+11 diberikan terapi GMH dan *Balance Aktif*.
- c. Sampel *secret* vagina dengan BV pada H+22 diberikan terapi GMH dan *Balance Aktif*.

4.5.2 Alat Penelitian

- a. Alat untuk pengambilan sampel *secret* vagina
Object glass, cawan petri, spuit (1cc), ependorf (1,5 cc), lidi *button*, *hand scoon*, Spekulum cocor bebek, etiket, plester (untuk fiksasi), tabung *anaerob*, *ice box*, Alat tulis.
- b. Alat untuk pemeriksaan kadar β -Defensins dan kadar slg A pada mukosa vagina
- c. *Phospat Buffer Saline* (PBS) steril 500 ml, mikropipet, ELISA Kit, sampel berupa *secret* vagina, tisu, dan *handscoen*.
- d. Alat untuk pemeriksaan Jumlah koloni Bakteri *Lactobacillus spp.* di mukosa vagina diantaranya *autoclave*, alat penghitung koloni, cawan petri, pipet gelas atau pipetor 0,1 ml & 1 ml, serta alat tulis. Sedangkan untuk media dan pereaksinya menggunakan *deMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA).

4.6 Definisi Operasional

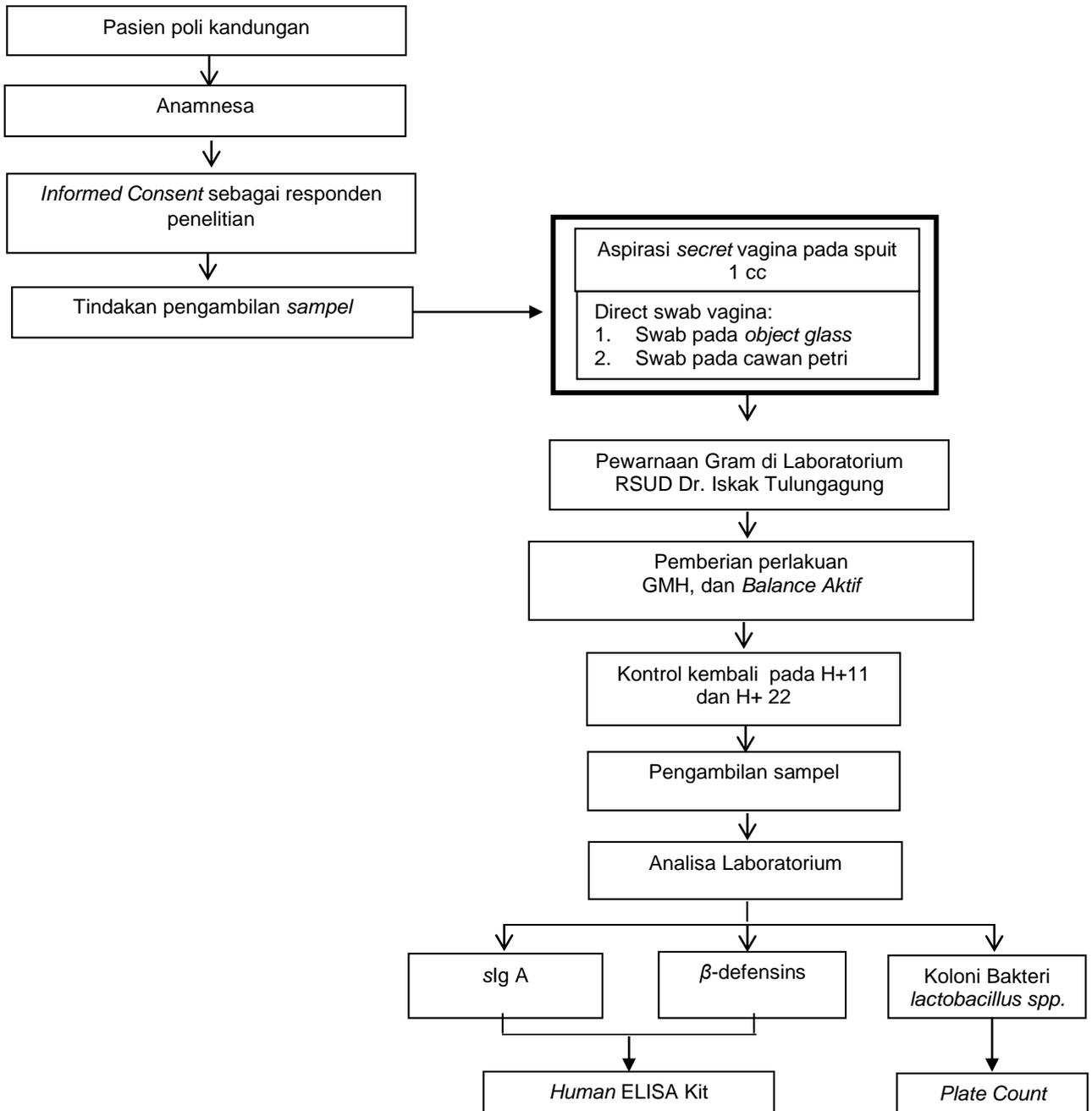
Definisi operasional yaitu menjelaskan semua variabel dan istilah yang akan digunakan dalam penelitian secara operasional, sehingga mempermudah pembaca/penguji dalam mengartikan makna penelitian (Nursalam, 2013).

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	<i>Independent : Glucomannan Hydrolysates (GMH)</i>	Pessary yang mengandung 300 mg GMH, berisi hasil ekstraksi dari tanaman konjac (sebagai polisakarida). Dalam hal ini digunakan untuk menutrisi dari pertumbuhan bakteri <i>lactobacillus spp.</i> yang menguntungkan berguna untuk menekan pertumbuhan patogen, dengan diproduksi substansi antimikrobia (asam, H ₂ O ₂ dan <i>bacteriocyn</i>). (Tester, 2011)	-	<i>Ratio</i>
2	<i>Independent : Balance Aktif</i>	<i>Balance Aktif</i> diproduksi oleh Rolf Kullgren AB, Agatan 4, PO-BOX 123 SE-646 22, Swedia. dan didistribusi oleh BBI Healthcare, Ltd. Penggunaan pada malam hari menjelang tidur, dengan dosis 5 cc dimasukkan pervaginam, yang mengandung asam laktat dalam kemasan tube, menghasilkan senyawa metabolit seperti asam organik (asam laktat dan asam asetat), karbondioksida (CO ₂) (Hendriani, 2009), <i>bacteriocyn</i> dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain (Pieter, 2005) sehingga menunjang keseimbangan flora normal <i>lactobacillus spp.</i> di genitalia wanita, menjadikan suasana lingkungan vagina menjadi asam, menekan perkembangan patogen.	-	<i>Ratio</i>
3	<i>Dependent : slg A</i>	slg A yang diambil dari <i>secret</i> mukosa vagina, pemeriksaan dilakukan secara sistematis dengan metode Elisa menggunakan kit dengan merk <i>Bioassay Technology Laboratory</i>	<i>Human ELISA kit</i>	<i>Interval</i>
4	<i>Dependent : β-defensins</i>	β-Defensins yang diambil dari <i>secret</i> mukosa vagina, pemeriksaan dilakukan secara sistematis dengan metode Elisa menggunakan kit dengan merk <i>Bioassay Technology Laboratory</i>	<i>Human ELISA kit</i>	<i>Interval</i>
5	Dependen : Koloni Bakteri <i>lactobacillus spp.</i>	sekumpulan dari bakteri-bakteri yang sejenis yang mengelompok menjadi satu dan membentuk suatu koloni-koloni. Jumlah koloni bakteri dihitung pada <i>secret</i> mukosa vagina dengan metode <i>plate count</i>	<i>Plate Count</i>	<i>Interval</i>
6	Variabel Kendali <i>Bacterial Vaginosis</i>	<i>Bakterial Vaginosis (BV)</i> adalah infeksi <i>polymicrobial</i> ditandai oleh kurangnya H ₂ O ₂ yang diproduksi <i>lactobacillus spp.</i> dan pertumbuhan berlebih dari organisme anaerob fakultatif seperti <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Prevotella bivia.</i> , <i>Peptostreptocci</i> , <i>Mobiluncus curtisii</i> (Donders, 2010; O'Hanlon, 2011)	<i>Nugent Score</i>	<i>Ratio</i> Kriteria Amsel's: Score 1-2: Non BV Score 3-4: Positif Bv <i>Nugent's Score:</i> 1. skor 0-3 : normal 2. skor 4-6 : intermediet 3. skor ≥ 7 : BV
7	Variabel Moderator Wanita Usia Subur	Wanita dengan keadaan organ reproduksi berfungsi dengan baik, usia antara 20-45 tahun. datang dengan keluhan keputihan, mengeluarkan cairan per vaginam berbau dan gatal tanpa disertai tanda gejala penyakit menular seksual	-	<i>Ratio</i>

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.7.2 Pengumpulan Data

- a. slg A pada *secret* mukosa vagina diukur dengan menggunakan Human ELISA Kit.
- b. β -defensins pada *secret* mukosa vagina diukur dengan menggunakan Human ELISA Kit.
- c. Jumlah koloni bakteri *lactobacillus spp.* pada *secret* mukosa vagina dapat ditentukan dengan metode cawan hitung (*Plate Count*).

4.8 Prosedur Pemeriksaan

4.8.1 Pengambilan Sampel

- a. Pasien diposisikan litotomi, spekulum cocor bebek dimasukkan kedalam vagina secara hati-hati, dengan menggunakan lidi *button* mengambil *secret* vagina setelah itu dioleskan pada cawan petri, kemudian pada *object glass*.
- b. Dengan hati-hati memasukkan Aquadess 1 cc dengan menggunakan spuit kedalam vagina, lakukan *douching* sebanyak 4-5 kali (mencampur aquadess dengan *secret* vagina yang dilakukan didalam lubang vagina), setelah yakin *secret* vagina sudah tercampur maka cairan vagina tersebut diambil dengan menggunakan spuit tadi 1 cc.

4.8.2 Pemeriksaan slg A

- a. Sebelum digunakan sampel harus disesuaikan dengan suhu ruang.
- b. Pemeriksaan dilakukan dengan metode ELISA.
- c. Pengenceran *standard solutions* :

4 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 5	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
2 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 4	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 5 + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
1 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 3	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 4+ 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
0.5 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 2	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 3+ 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
0.25 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 1	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 2 + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent

- d. Jumlah *stripes* yang dibutuhkan tergantung pada sampel yang akan di teliti dengan standar tersebut. Sangat disarankan bahwa tiap *standard solutions* dan tiap *blank well* dalam 2 rangkap.
- e. Injeksi sample :
1. *Blank well* : tidak dimasukkan sampel, *antibodi anti slgA* dilabel dengan *biotin* atau *streptavidin HRP* ditambahkan sebagai pembanding *blank well* kecuali *Substrate solution A* dan *B* dan *Stop solution* diberikan dalam step yang sama pada langkah selanjutnya.
 2. *Standar solution well* : dimasukkan 50 µl standard dan *streptavidin-HRP* 50µl (*antibody biotin* bergabung dalam *standar advance*. Jadi tidak ada *biotin antibody* yang ditambahkan).
 3. *Sample well* untuk dilakukan pemeriksaan : tambahkan 50 µl sampel dan tambahkan 10 µl *slg A antibody*, kemudian tambahkan 50 ul *streptavidin-HRP*, setelah itu tutup dengan *plate sealer*. Campur dengan baik. Simpan pada suhu 37 °C selama 60 menit.
- f. *Washing Solution*: melarutkan *washing concentration (30x)* dengan *distilled water* untuk digunakan nantinya.
- g. *Washing*: *plate sealer* dibuka secara hati-hati, isi tiap *well* dengan *washing solution* 0.35 ml selama 30 s.d 60 detik untuk setiap cuci. Tiriskan *liquid* setelah 30 s.d 60 detik. Ulangi langkah ini 5 kali.
- h. *Color development*: Tambahkan 50 µl larutan *substrate solution A* pada tiap well dan kemudian tambahkan 50 µl larutan *substrate solution B* pada tiap *well*. Inkubasi well ditutupi dengan *plate sealer* baru. Setelah itu simpan selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam keadaan gelap untuk *color development*.
- i. *Stop*: Tambahkan 50 µl larutan *stop solution* pada tiap *well* untuk menghentikan reaksi (warna biru akan berubah menjadi kuning seketika itu juga).

- j. *Assay*: diambil *blank well* sebagai *zero*, dilakukan pengukuran nilai absorbansi (OD) di tiap well dengan segera menggunakan *microplate reader* pada 450 nm *wavelength*, dalam 30 menit setelah menambahkan *stop solution*.
- k. Berdasarkan *standar concentration* dan *corresponding* jumlah OD, dihitung *regresi linear equation* dari kurva standar. Kemudian berdasarkan nilai OD sampel, dihitung konsentrasi dari *corresponding sample*. *Software* khusus dapat digunakan untuk menghitung ini secara tepat.

4.8.3 Pemeriksaan β -defensins

- a. Sebelum digunakan sampel harus disesuaikan dengan suhu ruang.
- b. Pemeriksaan dilakukan dengan metode ELISA.
- c. Pengenceran *standard solutions* :

4 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 5	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
2 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 4	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 5 + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
1 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 3	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 4+ 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
0.5 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 2	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 3+ 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent
0.25 $\mu\text{g/ml}$	Standard no. 1	120 $\mu\text{g/ml}$ Original standard No. 2 + 120 $\mu\text{g/ml}$ standard diluent

- d. Jumlah *stripes* yang dibutuhkan tergantung pada sampel yang akan di teliti dengan standar tersebut. Sangat disarankan bahwa tiap *standard solutions* dan tiap *blank well* dalam 2 rangkap.
- e. Injeksi sampel :
 1. *Blank well* : tidak dimasukkan sampel, *antibodi anti β -DF* dilabel dengan *biotin* atau *streptavidin HRP* ditambahkan sebagai pembanding *blank well* kecuali *Substrate solution A* dan *B* dan *Stop solution* diberikan dalam step yang sama pada langkah selanjutnya.
 2. *Standar solution well* : Tambahkan 50 μl standard dan *streptavidin-HRP* 50 μl (*antibody biotin* bergabung dalam *standar advance*. Jadi tidak ada *biotin antibody* yang ditambahkan).

3. *Sampel well* untuk di lakukan pemeriksaan : tambahkan 50 μ l sampel dan tambahkan 10 μ l β -DF *antibody*, kemudian tambahkan 50 μ l *streptavidin-HRP*, setelah itu tutup dengan *plate sealer*. Campur dengan baik. Simpan pada suhu 37 °C selama 60 menit.
- f. *Washing Solution*: melarutkan *washing concentration* (30x) dengan *distilled water* untuk digunakan nantinya.
- g. *Washing*: *plate sealer* dibuka secara hati-hati, isi tiap *well* dengan *washing solution* 0.35 ml selama 30 s.d 60 detik untuk setiap cuci. Tiriskan *liquid* setelah 30 s.d 60 detik. Ulangi langkah ini 5 kali.
- h. *Color development*. Tambahkan 50 μ l larutan *substrate solution* A pada tiap *well* dan kemudian tambahkan 50 μ l larutan *substrate solution* B pada tiap *well*. Inkubasi *well* ditutupi dengan *plate sealer* baru. Setelah itu simpan selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam keadaan gelap untuk *color development*.
- i. *Stop*: Tambahkan 50 μ l larutan *stop solution* pada tiap *well* untuk menghentikan reaksi (warna biru akan berubah menjadi kuning seketika itu juga).
- j. *Assay*: diambil *blank well* sebagai *zero*, dilakukan pengukuran nilai absorbansi (OD) di tiap *well* dengan segera menggunakan *microplate reader* pada 450 nm *wavelength*, dalam 30 menit setelah menambahkan *stop solution*.
- k. Berdasarkan *standar concentration* dan *corresponding* jumlah OD, dihitung *regresi linear equation* dari kurva standar. Kemudian berdasarkan nilai OD sampel, dihitung konsentrasi dari *corresponding sample*. *Software* khusus dapat digunakan untuk menghitung ini secara tepat.

4.8.4 Pemeriksaan Jumlah Koloni Bakteri *Lactobacillus Spp* pada Mukosa Vagina

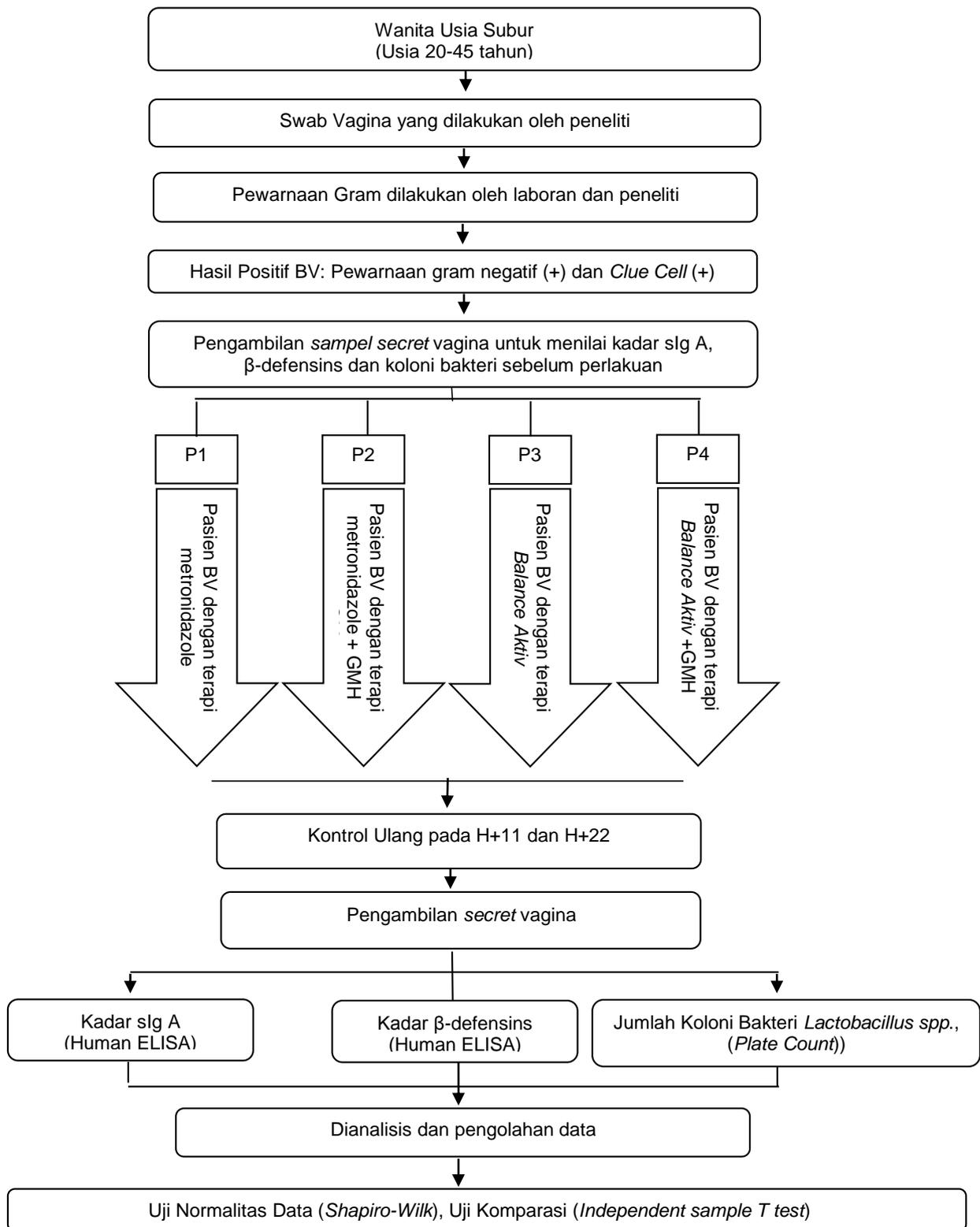
Metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar dapat dilakukan untuk pemeriksaan jumlah koloni bakteri. Prinsip dari metode cawan hitung agar sebar yaitu bila sel bakteri yang masih hidup ditumbuhkan pada medium, maka mikroba

tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang kemudian dapat dilihat langsung dan dihitung tanpa menggunakan mikroskop.

Prosedur pemeriksaan jumlah koloni bakteri sebagai berikut :

- a. Lakukan pengenceran sampel menggunakan larutan fisiologis.
- b. tahapan pengenceran dimulai dari membuat larutan sampel sebanyak 10 ml (campuran 1 ml/1gr sampel dengan 9 ml larutan fisiologis).
- c. Dari larutan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan masukkan kedalam 9 ml larutan fisiologis sehingga didapatkan pengenceran 10⁻².
- d. Dari pengenceran 10⁻² diambil lagi 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan fisiologis sehingga didapatkan pengenceran 10⁻³.
- e. Setelah dilakukan pengenceran, kemudian dilakukan penanaman pada media lempeng agar.
- f. Setelah diinkubasi, jumlah koloni masing-masing cawan diamati dan dihitung

4.9 Alur Penelitian



4.10 Analisa Data

Pada penelitian ini teknik analisis data dilakukan uji normalitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Shapiro – Wilk* sedangkan uji komparasinya menggunakan Uji Komparasi (*Repeated Measure ANOVA*). Semua perhitungan analisis data tersebut menggunakan software *SPSS for Windows 23*.

4.10.1 Uji Prasyarat parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dapat dipilih dengan pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik parametrik. Dan sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistik parametrik maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau berdistribusi normal. Jika p-value menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikan $\alpha = 0.05$ maka dapat ditarik kesimpulan bahwa data berdistribusi normal sehingga uji parametrik dapat digunakan (Sugiyono, 2012)

4.10.2 Uji Komparasi Repeated Measure ANOVA

Repeated Measures ANOVA digunakan untuk uji beda > 2 kali pengukuran dengan membandingkan rata-rata dua sampel yang saling berhubungan, namun pengukuran lebih dari dua kali (Henry, 2011)