

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2010). Populasi dalam penelitian ini adalah Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina.

4.2.2 Sampel

Sampel adalah objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi (Notoatmodjo, 2010). Sampel penelitian menggunakan model Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina yang kemudian diberikan perlakuan.

4.2.3 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang diambil sebagai subjek penelitian diperoleh dari perhitungan sampel dengan rumus $(t-1) (r-1) \geq 15$. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah:

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

n = jumlah pengulangan/besar sampel dalam kelompok

r = jumlah perlakuan/banyaknya kelompok.

Pada penelitian ini terdapat 5 perlakuan, sehingga nilai $t = 5$. Jadi hasil perhitungan diperoleh:

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3.75 + 1$$

$$r = 4.75$$

Dari hasil perhitungan didapat nilai r sebesar 4.75 dan dibulatkan menjadi

5. Sehingga pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

4.2.4 Randomisasi Sampel

Seluruh tikus sampel yang tersedia dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan berdasarkan *Simple Random Sampling* sehingga tiap tikus memiliki peluang yang sama untuk semua kelompok. Teknik *Simple Random Sampling* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus. Umumnya menggunakan 3 angka acak.
2. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus.
3. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis kandidat vaksin amoebiasis dengan menggunakan bahan Lec A bakteri *Staphylococcus aureus* yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang tidak dikondisikan amoebiasis dan tanpa diberikan vaksinasi.
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dikondisikan amoebiasis tanpa diberikan vaksinasi.
3. Kelompok 3: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan protein Lec A dengan dosis 0,1 cc/kgBB dan dikondisikan amoebiasis.
4. Kelompok 4: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan protein Lec A dengan dosis 0,15cc/kgBB dan dikondisikan amoebiasis.
5. Kelompok 5: Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan protein Lec A dengan dosis 0,2 cc/kgBB dan dikondisikan amoebiasis.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar IgG.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lingkup Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Maret – Juli 2013.

4.4.2 Lingkup Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Biomedik, dan Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

Bahan dan alat/instrumen penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut.

1. Perawatan Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar

Alat dan Bahan : kandang tikus, tempat minum, timbangan, pakan, terigu, air, dan sekam

2. Kultur *Staphylococcus aureus*

Alat dan Bahan : media BAP (*Blood Agar Plate*), media MSA (*Manitol Salt Agar*), media BAP (*Blood Agar Plate*), media penyubur BHI, incubator

3. Isolasi Protein Lec A – SDS Page (Pembuatan kandidat vaksin)

Alat dan Bahan : PBS pH 7,4; n-octyl- β -Dglucopyranoside (NOG); vortex; sentrifuge; Tris HCl pH 6,4; 2-mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfate 2.5%, v/v glyserol 10% dengan warna pelacak bromophenol blue; mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4%; coomassie brilliant blue.

4. Vaksinasi dan Boostering

Alat dan Bahan : syringe 3 cc, alcohol, vortex, adjuvant CFA, adjuvant IFA.

5. Pengambilan Darah

Alat dan Bahan : syringe 3 cc, sentrifuge, falcon, ependorf

6. Induksi *Entamoeba histolytica*

Alat dan Bahan : sonde tikus

7. Pengecekan IgG

Alat dan Bahan : ELISA kit untuk IgG, Pengecekan IgG dengan metode ELISA dengan menggunakan alat ELISA Reader BIO-FLAD

Model 550 Microplate Reader.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina dengan berat \pm 200 gram. Hewan ini adalah hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian ilmiah karena hewan tersebut tergolong jinak, perawatannya mudah, dan metabolisme tubuhnya mirip dengan metabolisme manusia.

4.6.2 Pengondisian Amoebiasis

Hewan coba yang diberikan perlakuan dikondisikan terkena amoebiasis dengan cara menginduksi *Entamoeba histolytica* sebanyak 2×10^5 permililiter. Penanda hewan coba (*Rattus norvegicus*) telah terinfeksi amoebiasis yang disebabkan oleh *Entamoeba histolytica* adalah dengan ditemukannya bentukan trophozoit dan disertai kemungkinan adanya pendarahan pada feses.

4.6.3 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica termasuk protozoa parasit dan bagian dari genus *Entamoeba*. Protozoa ini dapat menginfeksi manusia dan primata lainnya seperti tikus, kelinci dan lainnya. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh *Entamoeba histolytica* adalah amoebiasis.

4.6.4 *Staphylococcus aureus*

Bakteri gram positif yang digunakan sebagai bahan untuk pembuatan kandidat vaksin dengan memanfaatkan Lec A yang terkandung dalam bakteri tersebut.

4.6.5 Lec A

Merupakan protein yang mengikat *hydrophobic galactosides* dengan afinitas dan spesifikasi yang tinggi.

4.6.6 CFA dan IFA

Digunakan sebagai *adjuvant* vaksin. CFA dan IFA digunakan sebagai bahan untuk boosting.

4.6.7 IgG

Merupakan salah satu jenis protein. IgG memiliki komposisi tertinggi dalam antibody dan mengaktifkan sel darah putih untuk menentang serangan kuman serta bakteri.

4.7 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara pengambilan darah hewan coba untuk diukur IgG. Pengambilan darah dilakukan sebanyak dua kali, yaitu

pengambilan pertama setelah masa vaksinasi dan pengambilan kedua setelah diinduksi *Entamoeba histolytica*.

4.8. Cara Penelitian

4.8.1 Kultur *Staphylococcus aureus*

Koloni *Staphylococcus aureus* diambil sedikit pada media BAP (*Blood Agar Plate*) dan ditanam kembali pada media MSA (*Manitol Salt Agar*), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diambil kembali dari media BAP (*Blood Agar Plate*) pada koloni yang sama dan dikultur pada media penyubur BHI, inkubasi pada suhu 37°C, selama 12-18 jam.

4.8.2 Isolasi Protein Lec A dari *Staphylococcus aureus*

Modifikasi yang dilakukan adalah pada bagian sampel yang digunakan yaitu endapan pellet pada putaran terakhir dan tidak dilakukan kolom kromatografi. Pelet disuspensikan dengan PBS pH 7,4 sampai volumenya mencapai 5 kali, kemudian ditambahkan n-octyl- β -Dglucopyranoside (NOG) sehingga konsentrasinya mencapai 0,05 %. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan vorteks dengan menggunakan kecepatan penuh selama 1 menit. Setelah selesai melakukan homogenisasi maka dikerjakan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm. Pada suhu 4 °C selama 15 menit. Pada bagian endapannya dilakukan isolasi bagian biofilmnya dengan cara yang sama seperti langkah-langkah tersebut diatas. Perlakuan ini diulang sampai enam kali untuk didapat perbanyak. Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE. Sampel yang telah diencerkan dengan PBS diambil sebanyak 500 ml dipanaskan 100 °C selama 5 menit dalam 500

ml larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8 , 2-mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfat 2.5%, v/v glyserol 10% dengan warna pelacak bromophenol blue. Dipilih mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Bahan pewarna yang digunakan adalah coomassie brilliant blue. Digunakan molekul standard sigma range marker untuk mengetahui berat molekul dari antigen yang akan digunakan.

4.8.3 Ekstraksi Lec A

Protein dari *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dilakukan elektroforesis untuk mendapatkan Lec A yang nantinya digunakan sebagai bahan aktif vaksin amoebiasis. Gel dipotong lurus pada bobot molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam tabung membran dialisa memakai cairan penyangga elektroforesis running buffer. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis horisontal apparatus aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisa dengan cairan penyangga PBS dan PH 7,4 selama 2 X 24 jam @ 2 liter dan diganti 3 kali.

4.8.4 Penambahan Adjuvant

Sediaan adjuvant CFA (Complete Freud Adjuvant) dan IFA (Incomplete Freud Adjuvant) siap digunakan dalam suspensi cair tanpa memerlukan proses persiapan sebelumnya. Alasan memilih CFA dan IFA pada pembuatan vaksin ini mempertimbangkan peningkatan IgG sehingga pembentukan antibodi dapat dipercepat. Campur adjuvant dengan Lec A dari *Staphylococcus aureus* dengan perbandingan 1:1. Campur dengan *vortexing*.

4.8.5 Booster

Protein Lec A diinjeksikan secara intra peritoneal (i.p). Kelompok Perlakuan 1 mendapatkan dosis Lec A 0,1cc/KgBB; Kelompok Perlakuan 2 mendapatkan dosis Lec A 0,15cc/KgBB; Kelompok Perlakuan 3 mendapatkan dosis Lec A 0,2cc/KgBB.

4.8.6 Pengambilan Darah

Darah tikus masing-masing kelompok diambil sebanyak ± 1 cc melalui vena lateralis ekor.

4.8.7 Pengecekan IgG

Proses pertama adalah *coating* antigen yaitu menambahkan antigen ke dalam wadah uji. Tutup plate dan diinkubasi 24 jam dalam suhu 24° C. antigen yang telah diinkubasi dikeluarkan dari wadah uji (*wells*). Selanjutnya dicuci dua kali dengan larutan Buffer PBST dan dikocok selama 5 menit setiap pencuciannya. Lalu larutan buffer dalam *wells* dikeluarkan. Tambahkan *blocking* buffer untuk memblok pada wells yang kosong. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 1 jam dalam suhu 24 °C. Kemudian dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* untuk mengetahui kadar IgG dari masing-masing kelompok.

4.8.8 Pengondisian Amoebiasis

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang telah divaksinasi dikondisikan terkena amoebiasis dengan cara menginduksi tikus dengan *Entamoeba histolytica*.

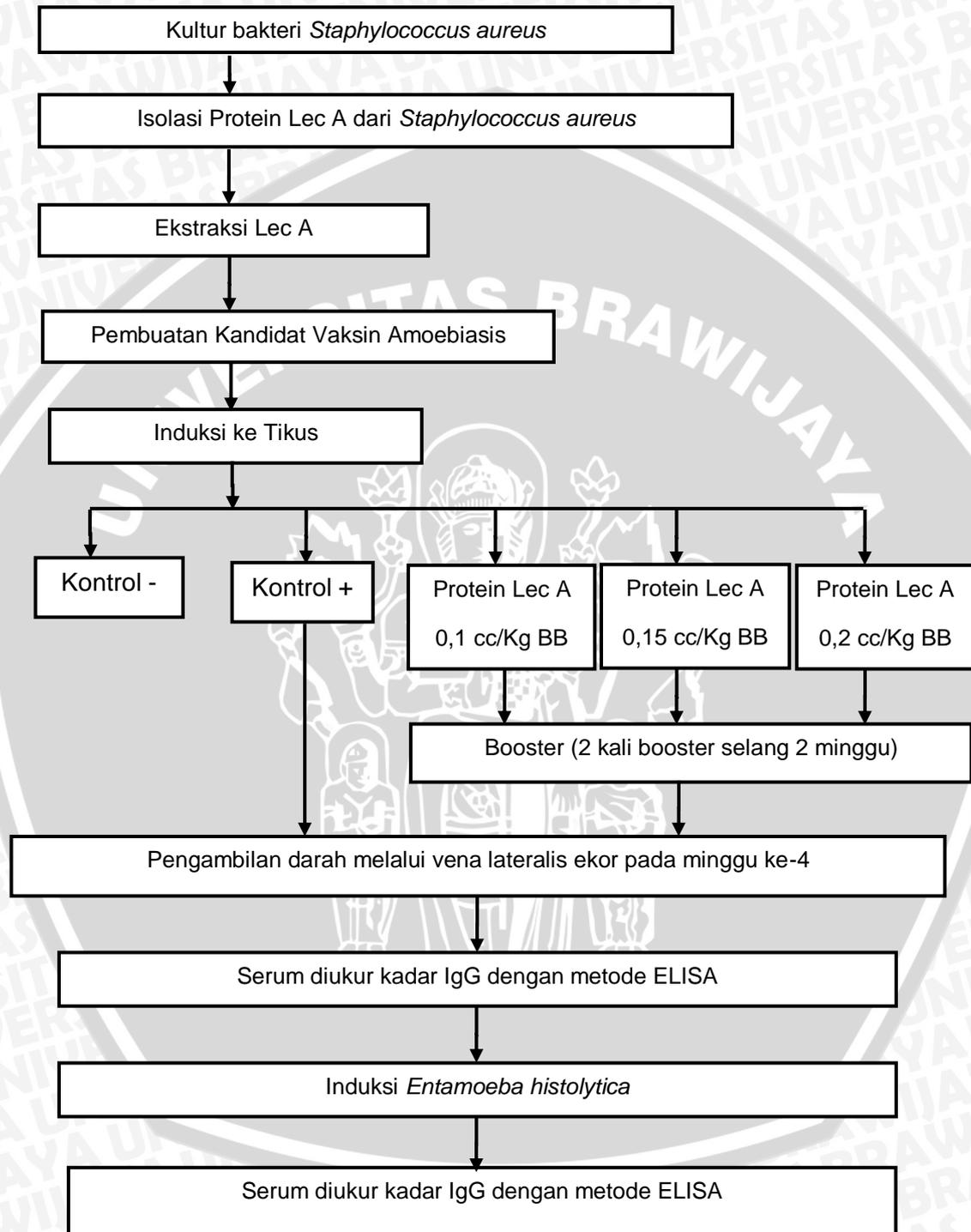
4.8.9 Prosedur Pengumpulan Data

Pengambilan data dilakukan dua kali yaitu setelah dilakukan induksi protein Lec A dan satu minggu setelah diberikan paparan *Entamoeba histolytica*. Data yang diambil berupa data-data hasil pengukuran IgG tikus.

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian untuk menentukan varian data sama atau tidak. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way ANOVA*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way ANOVA* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Uji korelasi juga dilakukan dengan metode *Spearman*. Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 16.

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian