

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah true experimental *study* dengan menggunakan *randomized post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara in vivo dengan tujuan untuk mengetahui keamanan dan efek samping pemberian vaksin kinoid IL-17A. 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.

Dalam penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh pemberian vaksin kinoid IL-17A terhadap tingkat kolonisasi bakteri pada organ hati mencit manifestasi sistemik erythematosus pasca injeksi methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Subjek penelitian terbagi menjadi tiga kelompok perlakuan, yakni kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan satu (P1), kelompok perlakuan dua (P2). Rinciannya adalah sebagai berikut:

- K : Hewan coba diinduksi lupus tanpa pemberian vaksin kinoid IL-17A dan tanpa pemberian bakteri methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
- P1 : Hewan coba diinduksi lupus, tanpa pemberian vaksin IL-17A dan dengan pemberian bakteri methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
- P2 : Hewan coba diinduksi lupus, dengan pemberian vaksin IL-17A dan pemberian bakteri methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

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 sebelumnya dijadikan model LES dengan cara pemberian pristane, dan diinjeksikan vaksin lalu dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai sesuai kelompok perlakuan. Peneliti yang akan melaksanakan penelitian ini 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 tes ANA

4.2.2 Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian

Berikut ini merupakan kriteria eksklusi mencit Balb/c model LES yang merupakan subjek pada penelitian ini:

1. Mencit yang selama penelitian mengalami hepatomogali
2. Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Pada penelitian ini jumlah sampel yang dibutuhkan menggunakan rumus sebagai berikut

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

p : jumlah perlakuan dalam kelompok

n : jumlah sampel dalam kelompok

Pada penelitian ini terdapat 3 perlakuan seperti yang disebutkan diatas, oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut

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

$$2n \geq 15$$

$$N \geq 7,5$$

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 betina model LES.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

1. Pemberian vaksin kinoid IL-17A 50 μ g secara intramuskular kepada mencit Balb/c betina model LES.
2. Pemberian bakteri methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal kepada mencit Balb/c betina model LES

4.4.2 Variabel Terikat

Kolonisasi bakteri pada organ hati

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba model lupus adalah mencit Balb/c yang sesuai kriteria inklusi dan eksklusi yang diinduksi pristane 0,5 mL secara intraperitoneal dan telah mendapatkan hasil tes ANA (+).

2. Vaksin kinoid IL-17A adalah protein rekombinan IL-17A yang dikongjugasikan dengan *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) sebagai karier, dengan metode pemberian aldehyde seperti yang telah dilakukan sebelumnya oleh peneliti sebelumnya dengan dosis pemberian 50µg (Zagury, *et al.* 2009). Pemberian vaksin dilakukan sebanyak tiga kali injeksi dengan rentang setiap tiga minggu sekali.

3. MRSA atau Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/ml yang nantinya akan dilakukan pencatatan efek MRSA tujuh hari kemudian untuk menilai kerentanan tubuh terhadap infeksi setelah dilakukan vaksinasi dengan cara penghitungan kolonisasi bakteri pada organ hati dengan menggunakan teknik kultur.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Tissue Burden pada Organ Hati

4.6.1.1 Kultur

Sprit 1cc, Falcon 15 mL, pinset, Nacl 0,9%, PBS, mortir stemper, timbangan pocket scale 100gr/500gr, tabung reaksi, rak tabung reaksi, APW, medium agar chrome plate.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/c yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusif, mencit Balb/c diperoleh dari LPPT UGM Yogyakarta karena telah memiliki sertifikasi mengenai keaslian strain Balb/c yang digunakan. Mencit Balb/c dipilih dalam penelitian ini dikarenakan data dari penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/c dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama tujuh hari. Mencit diberikan makanan standard dan ditempatkan didalam kandang yang dibersihkan setiap harinya. Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pemberian Pristane

Pristane yang didapatkan dari pabrik diinjeksikan ke mencit sesuai prosedur yang telah dideskripsikan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Semua kelompok coba diinduksi dengan pristane. Pristane diinjeksikan sebanyak 0,5 mL secara intraperitoneal. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit.

4.7.3 Pembuatan Bahan Vaksin Kinoid

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

tersertifikasi dan terjamin kemurniannya. Sitokin yang diperoleh 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 Zagury *et.al* (2009), secara singkat metodenya adalah sebagai berikut KLH dan mL-17A dilarutkan bersama kedalam PBS. Larutan mL-17A dan KLH tersebut kemudian dilarutkan dengan Gluteraldehyde (22,5 mM) dengan rasio 1:40. Gluteraldehyde 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). 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. Sehingga pada penelitian ini setiap perlakuan diberikan dengan dosis yang sama yaitu 50 µg.

4.7.4 Prosedur Imunisasi Vaksin Kinoid pada Mencit

Dosis kinoid IL-17A yang diberikan sebanyak 50 µg berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Rohn,*et.al*(2006) mengenai pemberian vaksin kinoid IL-17A terhadap arthritis dan ensefalomyelitis. Vaksin dicampurkan dengan adjuvant untuk meningkatkan respon antibody yang terbentuk terhadap antigen. 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 dicampurkan dengan adjuvant dengan konsenstrasi 1;1 (v/v). Campuran vaksin dengan CFA dilakukan pada injeksi primer atau injeksi pertama,

sedangkan untuk booster selanjutnya akan dilakukan dengan penambahan adjuvant IFA. Larutan vaksin dan adjuvant diinjeksikan secara intramuskular pada mencit sebanyak tiga kali setiap tiga minggu sekali (hari ke-0, 21, dan 42). Pemberian booster ini bertujuan untuk meningkatkan efektivitas vaksin agar meningkatkan reflek tubuh untuk memproduksi antibodi (Kroger, Andrew T. 2015). Kemudian mencit akan dibedah pada hari ke-60.

4.7.5 Prosedur Pembedahan

Pembedahan dilakukan setelah *euthanasia* dengan inhalasi gas eter. Teknik pembedahan dilakukan menurut prosedur tetap pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah:

- Mencit di *euthanasia* dengan inhalasi eter
- Mencit diposisikan pada papan bedah dengan pin
- Tubuh mencit dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan
- Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok
- Bila perlu, bulu mencit dicukur pada bagian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air.
- Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus (organ yang diambil adalah hati)
- Lemak lemak yang menempel pada organ dibersihkan.
- Organ dicuci dengan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah
- Organ kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% berulang-ulang
- Organ dimasukkan pada tabung falcon 15 mL yang telah berisi PBS 3 mL dan telah disterilkan dan ditutup rapat

- Organ pada falcon disimpan dilemari es 4°C sampai waktu kultur tiba
- Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
- Setelah dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, tubuh mencit dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan dengan sabun.

4.7.6 Prosedur Pengukuran Kolonisasi Bakteri pada Organ Hati

MRSA atau Methicillin-resistan *Staphylococcus aureus* diinjeksikan kedalam hewan coba secara intraperitoneal dengan dosis 10^8 cfu/mL dan inkubasi selama 7 hari. Kemudian dilakukan pembedahan terhadap organ. Organ hati diambil dari mencit lalu disimpan pada wadah yang telah disediakan. Organ yang telah diambil digerus dengan mortir, lalu ditimbang sama rata. Organ hasil gerusan yang telah ditimbang dibuat seri pengenceran dengan APW (Sampel organ dicampur dengan 9 mL APW kemudian dihomogenkan, dilakukan hingga 4 kali pengulangan). Setelah itu dibiakkan pada medium chrome agar plate. Pemiakkan dibiarkan di inkubasi selama 7 hari dan dilakukan pengamatan serta penghitungan bakteri dengan colony counter.

4.7.7 Metode Analisa Data

Dari metode *colony counter* yang telah dilakukan, akan didapatkan angka jumlah bakteri pada organ hati yang telah dikultur. Hasil dari penghitungan ini dilanjutkan dalam tahap analisis statistik, dimana analisis ini bertujuan untuk membandingkan hasil dari ketiga kelompok perlakuan untuk mengetahui apakah didapatkan perbedaan yang signifikan apa tidak. Analisis statistik ini meliputi:

1. Uji *Kolmogrov-smirnov*, untuk mengetahui bahwa sebaran data yang akan diuji terdistribusi normal. Hasil analisis dikatakan memiliki sebaran data normal jika didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$.
2. Uji *Levene Test*, untuk mengetahui bahwa varian data yang diuji adalah sama (homogen). Hasil analisis dikatakan memiliki varian data yang sama (homogen) jika didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$.
3. Uji *One-way ANOVA*, digunakan untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok yang diuji. Dari penghitungan statistik ini akan dapat diketahui perbedaan jumlah apakah terdapat perbedaan jumlah kolonisasi bakteri pada organ hati. Hasil analisis dikatakan terdapat perbedaan jumlah kolonisasi bakteri pada organ hati yang signifikan jika didapatkan nilai $p < 0,05$.
4. Uji *Post Hoc*, untuk mengetahui perbedaan jumlah kolonisasi bakteri dari ketiga kelompok. Uji *Post hoc* yang dipakai adalah uji *Tukey HSD*, dimana suatu data akan dikatakan terdapat perbedaan bermakna jika didapatkan $p < 0,05$.

4.8 Alur Penelitian

