

BAB III

MATERI DAN METODA PENELITIAN

TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Pengambilan contoh sera yang berupa sera darah babi dan kambing, dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Kotamadya Surabaya. Pemeriksaan contoh sera secara serologis dengan metoda uji hemaglutinasi tak langsung (IHA), dilakukan di Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penelitian ini dilakukan selama bulan Januari 1987, meliputi pengumpulan dan pemeriksaan contoh sera darah babi dan kambing.

3.1. MATERI PENELITIAN

3.1.1. Bahan Penelitian

Serum darah (32 sera darah babi dan 31 sera darah kambing), kit toxoplasmosis buatan Behring (berisi : antigen Tox-IHA, reagensia kontrol, larutan bufer pH 8,1 dan serum positif serta negatif) dan aquabidest.

3.1.2. Peralatan Penelitian

Tabung pemusing steril dengan tutup karet, tabung reaksi 10 cm x 10 mm steril dengan tutup karet, spuit disposibel 5 ml, spuit tuberkulin, microplate bentuk 'V', pipet

otomatis Eppendorf, pipet Dropper 25 ul, pipet Pasteur, microdiluter 25 ul, alat pemusing, penangas air, termometer Celcius, termos es, microshaker, freezer, api bunsen, kaca pembesar, kertas tisu basah dan kering.

3.2. METODA PENELITIAN

Dalam penelitian ini, contoh sera dikumpulkan secara acak sistematis (Budiarto, 1984). Selanjutnya diperiksa secara serologis menggunakan metoda uji hemaglutinasi tak langsung (IHA) dengan teknik mikrotiter modifikasi Behring Institute (Anonymous, 1985). Metoda uji ini mempunyai prinsip : Bila serum darah yang diperiksa mengandung Ig G antibodi T. gondii ditambahkan sel darah merah yang telah dilapisi dan disensitisasi dengan antigen T. gondii akan terjadi hemaglutinasi (Jacobs and Lunde, 1957 ; Nation and Allen, 1976).

Pemeriksaan contoh sera dengan metoda uji ini, meliputi cara kualitatif dan kuantitatif. Pada pemeriksaan kualitatif, pengenceran serum dari 1 : 8 sampai dengan 1 : 64. Bila pada pengenceran 1 : 64 masih terjadi hemaglutinasi, maka dilanjutkan dengan pemeriksaan secara kuantitatif untuk mengetahui pengenceran serum tertinggi yang masih menunjukkan hemaglutinasi. Hasil pemeriksaan contoh sera terhadap adanya antibodi T. gondii dengan metoda uji IHA dikatakan positif, bila titer antibodi $\geq 1 : 16$ (Krahenbuhl and Remington, 1982).

Cross dkk. (1976) menentukan titer positif antibodi T. gondii $\geq 1 : 16$ pada metoda uji hemaglutinasi tak langsung terhadap sera darah babi dan kambing.

3.2.1. Pengumpulan Contoh Sera

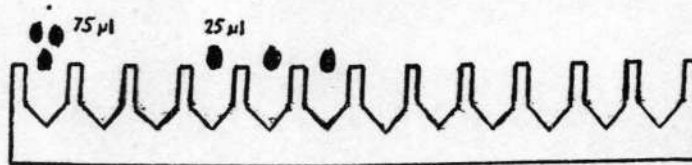
Contoh sera dikumpulkan dari babi dan kambing di RPH Pegirian secara acak, dalam empat kali pengumpulan dengan interval satu minggu. Setiap pengumpulan, diambil 15 - 16 contoh sera darah babi dan kambing. Pada babi, diambil setiap pemotongan ke empat tiap 16 ekor babi yang akan dipotong. Pada kambing, diambil setiap pemotongan ke tujuh dari delapan blok pemotongan. Pengambilan contoh sera, diawali dengan mengambil darah melalui vena jugularis dengan spuit disposable 5 ml sebanyak 5 - 6 ml. Darah yang didapat dipindahkan ke tabung pemusing dan disimpan di termos es. Selanjutnya dipusingkan, serum yang didapat dipindahkan ke tabung 10 cm x 10 mm dengan pipet Pasteur dan disimpan pada $- 20^{\circ}\text{C}$ sampai dilakukan pemeriksaan. Contoh sera diinaktifasi pada 56°C selama 1 jam sebelum diperiksa dengan metoda uji hemaglutinasi tak langsung terhadap adanya antibodi T. gondii (Durfee dkk., 1976 ; Cross dkk., 1976 ; Garcia dkk., 1979 ; Budiarto, 1984 ; Anonymous, 1985).

3.2.2. Pemeriksaan Secara Kualitatif (gambar 5)

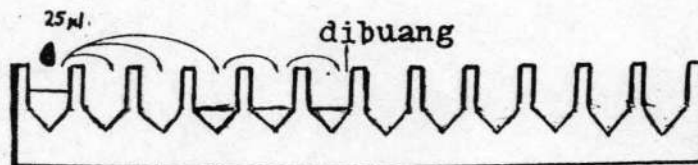
Dilakukan dengan cara kerja berikut : Pipet Eppendorf digunakan untuk mengisi sumur I pada microplate bentuk 'V' sebanyak 75 ul larutan bufer dan masing-masing 25 ul ke sumur IV, V dan VI. Pipet Dropper 25 ul dipakai untuk mengisi sumur I dengan 25 ul contoh serum (untuk uji kontrol, diisi dengan serum positif atau negatif), diaduk dan dipindahkan dengan pipet Eppendorf ke sumur II, III dan IV masing-masing 25 ul. Isi sumur IV diaduk dengan microdiluter 25 ul dan dipindahkan ke sumur V, dalam sumur V diaduk dan dipindahkan ke sumur VI. Isi sumur VI diaduk dan dibuang 25 ul. Pipet Dropper 25 ul dipakai untuk mengisi sumur II dengan reagensia kontrol sebanyak 25 ul. Pengisian sumur III, IV, V dan VI masing-masing 25 ul antigen Tox-IHA dengan menggunakan pipet Eppendorf. Microplate dikocok di atas microshaker secara perlahan selama beberapa detik. Selanjutnya dibiarkan pada suhu kamar selama 2 - 3 jam. Hasil pemeriksaan dibaca dengan bantuan kaca pembesar (Anonymous, 1985).

Gambar 5 : Skema metoda uji hemaglutinasi tak langsung pada pemeriksaan secara kualitatif (Anonymous , 1985).

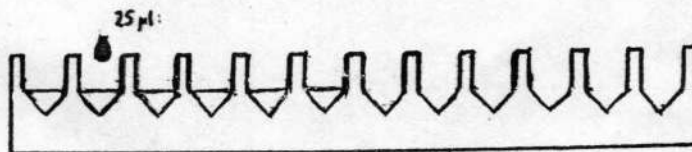
5.1. Pengisian larutan bufer pH 8,1



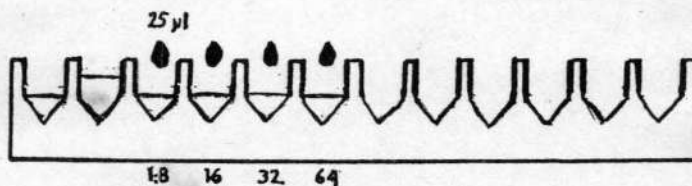
5.2. Pengisian contoh serum dan pengenceran



5.3. Pengisian reagensia kontrol



5.4. Pengisian antigen Tox-IHA



5.5. Pengocokan microplate di atas microshaker

5.6. Diinkubasi pada suhu kamar selama 2 - 3 jam

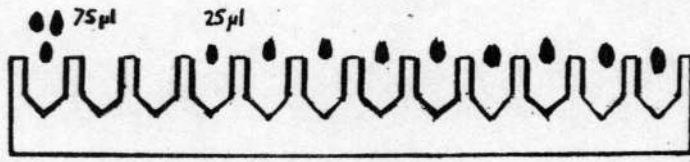
5.7. Pembacaan hasil.

3.2.3. Pemeriksaan Secara Kuantitatif (gambar 6)

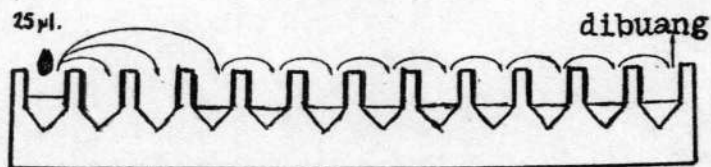
Dilakukan dengan cara kerja berikut : Pipet Eppendorf dipakai untuk mengisi sumur I pada microplate bentuk 'V' dengan 75 ul larutan bufer dan masing-masing 25 ul ke sumur IV sampai dengan sumur XII. Pipet Dropper 25 ul digunakan untuk mengisi sumur I dengan 25 ul contoh serum (serum yang masih menunjukkan hemaglutinasi pada pengenceran 1 : 64 dalam pemeriksaan kualitatif), diaduk dan dipindahkan dengan pipet Eppendorf ke sumur II, III dan IV masing-masing 25 ul. Isi sumur IV diaduk dengan microdiluter 25 ul dan dipindahkan ke sumur V dan seterusnya dengan cara yang sama sampai sumur XII. Isi sumur XII diaduk dan dibuang 25 ul. Pipet Dropper 25 ul dipakai untuk mengisi sumur II dengan 25 ul reagensia kontrol. Pipet Eppendorf digunakan untuk mengisi sumur III sampai dengan sumur XII masing-masing 25 ul antigen Tox-IHA. Microplate dikocok di atas microshaker secara perlahan selama beberapa detik, selanjutnya dibiarkan pada suhu kamar selama 2 - 3 jam. Hasil pemeriksaan dibaca dengan bantuan kaca pembesar (Anonymous, 1985).

Gambar 6 : Skema metoda uji hemaglutinasi tak langsung pada pemeriksaan secara kuantitatif (Anonymous, 1985).

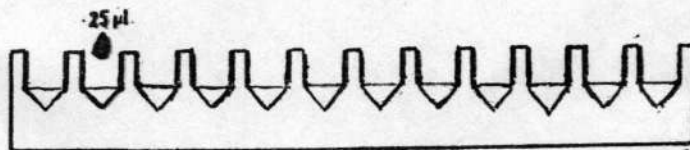
6.1. Pengisian larutan bufer pH 8,1



6.2. Pengisian contoh serum dan pengenceran



6.3. Pengisian reagensia kontrol



6.4. Pengisian antigen Tox-IHA



6.5. Pengocokan microplate di atas microshaker

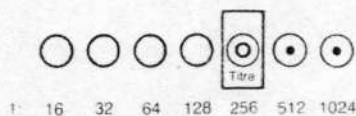
6.6. Diinkubasi pada suhu kamar selama 2 - 3 jam

6.7. Pembacaan hasil.

3.2.4. Kriteria Pembacaan Hasil Pemeriksaan

Reaksi positif ditandai adanya hemaglutinasi yang membentuk endapan sel dan menutupi seluruh dasar sumur dengan tepian berlipat, hemaglutinasi membentuk endapan sel yang menutupi sebagian dasar sumur dan hemaglutinasi membentuk endapan sel pada dasar sumur yang dikelilingi cincin merah.

Reaksi negatif ditandai tidak adanya hemaglutinasi. Titer antibodi T. gondii dinyatakan dengan pengenceran serum tertinggi yang masih menunjukkan hemaglutinasi (gambar 7) (Anonymous, 1985).



Gambar 7 : Pembacaan hasil pemeriksaan (Anonymous, 1985).

3.3. ANALISIS DATA HASIL PENELITIAN

Pengujian hipotesis nol (H_0) yang berbunyi tidak ada perbedaan prevalensi antibodi T. gondii antara babi jantan dengan babi betina, antara kambing jantan dengan kambing betina dan antara babi dengan kambing, digunakan uji statistik metoda Chi-Kuadrat (Steel and Torrie, 1980 ; Budiarto, 1984).

Rumus Chi-Kuadrat (χ^2) :

$$\chi^2 = \frac{(n_{11} n_{22} - n_{12} n_{21})^2 n_{..}}{n_{1.} n_{2.} n_{.1} n_{.2}}$$

Bila derajat bebas = 1 dan frekuensi ekspektasi salah satu sel kurang dari lima, maka digunakan rumus :

$$\chi^2 = \frac{(|n_{11} n_{22} - n_{12} n_{21}| - \frac{1}{2} n_{..})^2 n_{..}}{n_{1.} n_{2.} n_{.1} n_{.2}}$$

Keterangan :

n_{11} = Frekuensi baris ke 1 dan kolom ke 1.

$n_{1.}$ = Jumlah frekuensi baris ke 1.

$n_{.1}$ = Jumlah frekuensi kolom ke 1.

$n_{..}$ = Jumlah frekuensi total.

Kriteria penilaian uji hipotesis :

Hipotesis nol (H_0) : Tidak ada perbedaan.

Hipotesis alternatif (H_A) : Ada perbedaan.

Derajat bebas (db) = (baris - 1) (kolom - 1).

Bila $\chi^2_{hitung} < \chi^2_{\alpha} = 5\% (1)$, maka H_0 diterima.

Bila $\chi^2_{hitung} > \chi^2_{\alpha} = 5\% (1)$, maka H_A diterima.

Harga rata-rata titer positif antibodi T. gondii diperoleh dengan cara merubah titer ke bentuk log dasar 2, kemudian dikalikan frekuensi contoh sera positif. Hasil bagi antara jumlah perkalian tersebut dengan jumlah frekuensi contoh sera positif dimasukkan ke dalam daftar Brugh pada lampiran ke enam (Brugh, 1978).

Pengujian hipotesis yang berbunyi tidak ada perbedaan harga rata-rata titer positif antibodi T. gondii antara babi dengan kambing, digunakan analisis statistik metoda Student's t (Steel and Torrie, 1980 ; Sudjana, 1982 ; Budiarto, 1984).

Rumus Student's t :

$$t' = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{(s_1^2 / n_1) + (s_2^2 / n_2)}}$$

$$s_1^2 = \frac{\sum X_1^2 - (\sum X_1)^2 / n_1}{n_1 - 1}$$

$$s_2^2 = \frac{\sum X_2^2 - (\sum X_2)^2 / n_2}{n_2 - 1}$$

Kriteria penilaian uji hipotesis :

Hipotesis nol (H_0) : Tidak ada perbedaan, diterima bila :

$$- t_{\alpha = 5\%} < t' < t_{\alpha = 5\%}$$

Hipotesis alternatif (H_A) : Ada perbedaan, diterima bila :

$$t' > t_{\alpha = 5\%}$$

$$t' < - t_{\alpha = 5\%}$$

$$t_{\alpha = 5\%} = \frac{W_1 t_1 + W_2 t_2}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

X = Contoh

\bar{X} = Rata-rata contoh

s = Simpangan baku contoh

n = Jumlah contoh

$W_1 = s_1^2 / n_1$

$W_2 = s_2^2 / n_2$

$t_1 = t$ dalam tabel dengan $\alpha = 5\%$ dan db = $n_1 - 1$

$t_2 = t$ dalam tabel dengan $\alpha = 5\%$ dan db = $n_2 - 1$

db = Derajat bebas.