

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* di laboratorium secara *in vivo* dengan *post test only controlled group design*. Sampel penelitian dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan, seperti yang tertera pada Tabel 4.1 dan alur penelitian ditunjukkan pada Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	Hewan coba diberikan diet tanpa diet tinggi lemak dan tanpa diberikan vaksinasi
Kontrol Positif	Hewan coba diberikan diet tinggi lemak dan tanpa diberikan vaksinasi
Kelompok A	Hewan coba diberikan diet tinggi lemak dengan diberikan injeksi vaksin* 100 µl + ajuvan CFA – IFA (<i>Complete Freund's Adjuvant - Incomplete Freund's Adjuvant</i>) 100 µl/ injeksi
Kelompok B	Hewan coba diberikan diet tinggi lemak dengan diberikan injeksi vaksin <i>heat killed</i> S. Typhimurium 100 µl/ injeksi
Kelompok C	Hewan coba diberikan diet tinggi lemak dengan diberikan injeksi vaksin ajuvan CFA – IFA 100 µl/ injeksi

Keterangan: * vaksin merupakan *heat killed* bakteri S. Typhimurium

Sebelum dilakukan pengelompokan, hewan coba dilakukan aklimatisasi selama satu minggu. Pemberian diet tinggi lemak yang bertujuan untuk menginduksi terjadinya obesitas dan atherosklerosis dilakukan setelah aklimatisasi dan diberikan selama 50 hari, dan berat badan tikus juga diukur setiap minggunya.

4.2 Besar Sampel

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut:

$$n(p - 1) \geq 15 \quad (\text{Notobroto, 2005})$$

(p: jumlah perlakuan, n: jumlah ulangan), p = 5, sehingga:

$$n(5 - 1) \geq 15 ;$$

$$4n \geq 15 ;$$

$$n \geq 3,75.$$

Dibulatkan ke atas menjadi 4 pengulangan

Sampel penelitian adalah tikus *Rattus Norvegicus* galur Wistar jantan usia 6-8 minggu yang diperoleh dari peternak tikus dan dipelihara di laboratrium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dengan berat 100–200 gram yang dipilih memiliki bulu putih bersih, tingkah laku normal, bergerak aktif, dan keadaan secara umum sehat.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari 2013 sampai Juli 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian terdiri dari pemberian diet normal, diet tinggi lemak dan vaksin *heat killed* bakteri *S. Typhimurium*.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian adalah kadar TNF- α serum tikus.

4.5 Definisi Operasional

- Diet tinggi lemak: pemberian diet tinggi lemak dimaksudkan untuk menginduksi pembentukan plak atherosklerosis pada sub endotel aorta tikus, perubahan profil lipid, dan menimbulkan terjadinya obesitas pada hewan coba. Diet dengan komposisi yang telah ditentukan (komposisi standar yang telah teruji keberhasilannya) diberikan sebanyak 40 gram tiap harinya dalam bentuk bulatan agar tekstur makanan tidak rusak. Diet diberikan dengan cara memasukkannya ke dalam kandang, diet tidak diberikan di luar kandang. Sisa pakan diukur beratnya setiap hari menggunakan timbangan digital dan juga dilakukan penimbangan berat badan setiap minggunya (Mutiyani, 2005).
- *S. Typhimurium*: merupakan salah satu bakteri batang Gram negatif yang diperoleh dari *human strain* (dari manusia) dan dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan sebagai bahan vaksin, bakteri dibiakkan dan diidentifikasi ulang terlebih dahulu (Brooks, *et al.*, 2007).

- *Heat killed vaccine*: pembuatan vaksin dari bakteri *Salmonella Typhimurium* dengan *boiling method* atau pemanasan pada suhu 100°C selama 45 menit menggunakan *waterbath*.
- *Complete Freund's Adjuvant (CFA)* dan *Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)*: CFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan pertama, sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan vaksin paparan berikutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, (produk Sigma).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Perawatan tikus

a) Alat:

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm; Tutup kandang tikus terbuat dari kawat; Botol air minum tikus; Sekam untuk kandang tikus; Timbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

4.6.2 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak

a) Alat:

Timbangan; Neraca analitik; Baskom; Pengaduk; Gelas ukur; Penggiling pakan; Nampan.

b) Bahan diet normal:

PAR-S; Tepung terigu; Air.

c) Bahan diet tinggi lemak:

PAR-S; Tepung terigu; Asam cholat; Minyak babi; Minyak kambing; Minyak kelapa; Kuning telur bebek; Air.

4.6.3 Isolasi dan Kultur *Salmonella Typhimurium*

a) Alat:

Tabung reaksi; Agar plate; Vortex; Microbact; Incubator.

b) Bahan:

Brain Heart Infusion (BHI) medium; Bismuth Sulfite Agar, *Bacteria Identification Test Kit*.

4.6.4 Pembuatan dan Penyuntikan Vaksin

a) Alat:

Eppendorf; Micropipette; Waterbath; Spektrofotometri; Vortex.

b) Bahan:

Isolat Bakteri *Salmonella Typhimurium*; *Complete Freund's Adjuvant* (CFA); *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA); PBS pH 7,2.

4.6.5 Pembedahan Tikus

a) Alat:

Gunting bedah; Pinset; Jarum pentul; Steroform; Kapas.

b) Bahan:

Kloroform; Formalin 10%; Alkohol 70%; Wadah plastik dan penutup wadah; S spuit injeksi insulin 1; Vacuotainer.

4.6.6 Pengukuran Kadar TNF- α Serum

a) Alat:

Microfudge tube 1 ml; *Microplate*; Pipets; *Volumetric container*, *Volumetric pippete*; Inkubator; *ELISA reader*.

b) Bahan:

ELISA TNF- α kit; *De-ionized water*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan tikus

Tikus Wistar dirawat di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Terdapat satu tikus di dalam satu kandang. Tikus diberi makan sehari sekali, dan sekam diganti dua kali setiap minggunya.

4.7.2 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak

Pembuatan diet normal dilakukan setiap hari dengan komposisi untuk setiap tikus sebagai berikut:

Tabel 4.2 Komposisi Diet Normal (Mutiyani, 2005)

PAR-S	Tepung Terigu	Air
25,6 g	14 g	0,4 g
Total diet normal = 40 gram/tikus/hari		

Pembuatan diet tinggi lemak dilakukan setiap hari dengan komposisi untuk setiap tikus sebagai berikut:

Tabel 4.3 Komposisi Diet Tinggi Lemak (Mutiyani, 2005)

PAR-S + Tepung Terigu	Asam cholot	Minyak babi	Minyak kambing	Minyak kelapa	Kuning telur	Air
30 g	0,05 g	3,22 ml	4 ml	0,4 ml	2 g	0,33 g
Total diet tinggi lemak = 40 gram/tikus/hari						

Bahan disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah kemudian dicampur, ditambah air secukupnya dan diaduk rata. Pakan dibentuk bulatan-bulatan kemudian ditimbang dengan total sebesar 40 gram untuk tiap ekor tikus. Sisa pakan tikus ditimbang setiap hari dan berat badan tikus diukur setiap minggu.

4.7.3 Isolasi dan Kultur *Salmonella Typhimurium*

Isolat bakteri *S. Typhimurium* diperoleh dari isolat manusia yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Setelah dilakukan peremajaan bakteri, identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Gram, kultur bakteri, tes gula-gula, tes motilitas, tes oksidase, dan *Microbact system*.

4.7.4 Pembuatan dan Penyuntikan Vaksin

S. Typhimurium pada *Brain Heart Infusion* (BHI) dipisahkan dari medium kulturnya. Bakteri sebanyak 10^8 diukur menggunakan spektrofotometer dan disuspensikan ke dalam *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,2 100 μ L tiap injeksi pada wadah Luria broth. Bakteri dimatikan dengan *boiling method* pada suhu 100°C selama 45 menit menggunakan *boiling-water bath* (Thatte, *et al.*, 1995). Penambahan ajuvan dilakukan setelah bakteri dimatikan, ajuvan yang digunakan adalah ajuvan CFA-IFA. Pencampuran ajuvan dengan antigen bakteri sebanyak 1:2 (v/v) sehingga dalam satu kali injeksi dibutuhkan 100 μ l ajuvan yang tercampur dalam 100 μ l antigen bakteri yang terlarut di dalam larutan PBS. Pencampuran ajuvan dan antigen dilakukan dengan *vortexing* sampai terbentuk emulsi berwarna putih yang homogen (Thatte, *et al.*, 1995).

Vaksin disuntikkan setiap dua minggu sekali sebanyak lima kali dimana vaksin terdiri atas satu injeksi primer dan empat injeksi *booster*. Injeksi primer

diberikan pada minggu pertama atau hari ke-0 pemberian diet dimana bahan vaksin diinjeksikan secara subkutan. Ajuvan yang diberikan pada saat injeksi primer adalah CFA. Kemudian injeksi *booster* diberikan selama dua minggu berturut-turut mulai dari minggu kedua atau hari ke-7 sebanyak empat kali dimana penyuntikannya dilakukan secara intraperitoneal. Ajuvan yang diberikan selama injeksi *booster* adalah IFA (Thatte, *et al.*, 1995; Binder, *et al.*, 2003).

4.7.5 Pembedahan Tikus

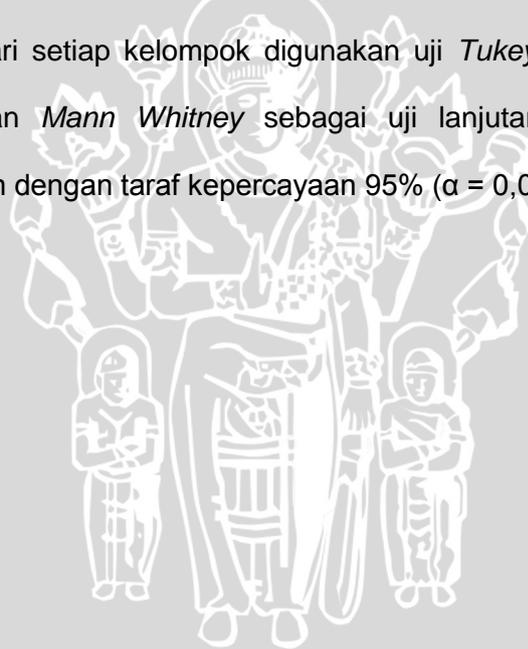
Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Tikus yang sudah dianestesi diletakkan di atas sterofoam, difiksasi, lalu dibedah mulai dari bagian perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 5 ml melalui jantung.

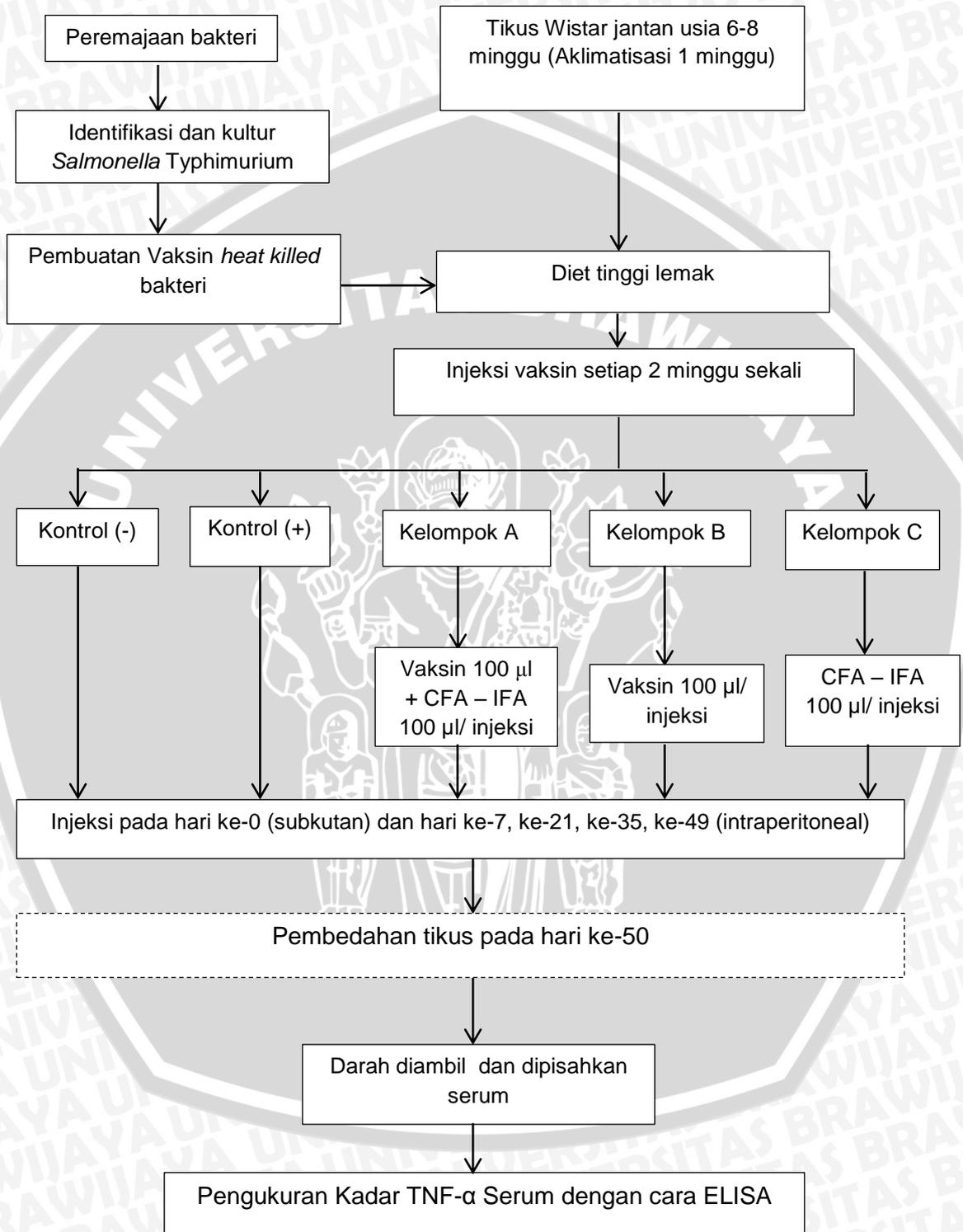
4.7.6 Pengecekan Kadar TNF- α Serum

Kadar TNF- α serum diukur dengan menggunakan ELISA TNF- α kit dan ELISA reader ELX 800 *Universal Microplate Reader* yang didapat dari hasil serum darah tikus yang sudah dibedah. Prosedur ELISA awalnya adalah serum diletakkan di dalam well, kemudian melakukan dilusi terlebih dahulu dalam *coating buffer*, dilanjutkan dengan mengeblok protein *binding site*, lalu ditambahkan antibodi primer, antibodi sekunder terkonjugasi, SA-HRP, substrat solution, dan stop solution. Prinsip ELISA adalah menggunakan ikatan antara antigen dengan antibodi yang spesifik terhadap bahan tersebut. Dengan terciptanya ikatan ini, pada akhirnya bisa memancarkan warna yang kemudian dibaca oleh ELISA reader berupa *optical density*. Hasil pembacaannya dinyatakan dalam satuan mikrogram per mililiter.

4.7.7 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data Kadar TNF- α Serum

Pengambilan data dilakukan setiap hari, setiap minggu, dan pada pembedahan hari ke-50 setelah pemberian asupan diet. Data yang diambil berupa data asupan diet yang diambil setiap harinya, data berat badan yang diambil setiap minggunya, dan data kadar TNF- α serum. Kemudian 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*. Untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Tukey* sebagai lanjutan *One-way ANOVA* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Penelitian ini dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian