

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true eksperimental post test only, control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari paparan profilin *Toxoplasma gondii* pada kadar NF- κ B dalam kultur adiposit. Penelitian ini menggunakan randomisasi dalam pemilihan sampel. Metode yang dipakai adalah rancangan acak lengkap (RAL) karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan lainnya bersifat homogen. Sel adiposit (lemak putih) yang telah dikultur akan diberikan profilin *Toxoplasma gondii* dalam berbagai dosis. Setelah 24 jam akan dilakukan pengukuran kadar NF- κ B dari sel adipositnya untuk mengetahui pengaruh profilin *Toxoplasma gondii* terhadap kadar NF- κ B.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel diambil dari kultur adiposti *in vitro*. Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan dengan pengulangan sebanyak 4 kali yang terdiri dari :

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif	Kultur adiposit
Kontrol Positif	Kultur adiposit + IBMX Dexamethasone
Profilin (D2)	Kultur adiposit + profilin 5 μ g
Profilin (D3)	Kultur adiposit + profilin 20 μ g
Profilin (D4)	Kultur adiposit + profilin 40 μ g

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah profilin dari parasit *Toxoplasma gondii* dalam dosis 5 µg, 20 µg dan 40 µg

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar NF-κB dalam sel adiposit.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk kultur adipositnya dan pembacaan memakai spectrophotometri dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu dimulai bulan Februari sampai bulan Mei tahun 2016.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

- 1) Alat untuk kultur *precursor* jaringan adiposit sel lemak putih dibutuhkan laminar flow, tissue culture incubator 5% CO₂ atmosphere, 37°C, Polypropylene steril test tube 15cc dan 50 cc, flask/plate culture, petri dish, mikropipet steril, gunting lengan panjang, forceps, nylon

mesh/filter mesh 0,2 μm , pinset, pipeting aid, spuit, tip, mikroskop inverted, dan mesin sentrifuge.

- 2) Alat untuk memaparkan profilin ke kultur adiposit berupa mikropipet dengan pengaturan beberapa dosis.
- 3) Alat untuk melakukan pemeriksaan ELISA sesuai ELISA KIT adalah Micro ELISA Plate 8 wells x 12 strips beserta *plate sealer* dan 96- well ELISA Plate reader Colorimetric.

4.5.2 Bahan Penelitian

- 1) Tikus wistar berumur 4-8 minggu.
- 2) Bahan untuk kultur *precursor* jaringan adiposit sel lemak putih dibutuhkan beberapa bahan kimia sebagai medianya yaitu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), NaHCO_3 , HCl, antibiotika, dan antifungal untuk membuat sel lemak *mature*, Fetal Bovine Serum (FBS) untuk sumber nutrisi, deionized water ($\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$)/air steril untuk pelarut, kolagenase tipe I untuk memecah matriks (melepaskan sel target), dan Trypsin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) untuk melepas jaringan adiposit dari media kultur.
- 3) Bahan yang dipaparkan ke kultur adiposit adalah rekombinan profilin *T.gondii* yang telah didapat dari plasmid *E.coli*.
- 4) Reagen terdapat dalam Rat NF- κB p105 (Nuclear factor NF-kappa –B p105 subunit) ELISA Kit dengan nomer catalog E-EL-R0673 yang dibeli dari Elabscience adalah Reference Standard 2 vials, Reference Standard dan Sample Diluent 20 mL, Concentrated Biotinylated Detection Ab 120 μL , Biotinylated Detection Ab Diluent 10 mL, Concentrated HRP Conjugate 120 μL , HRP Conjugate Diluent 10 mL,

Concentrated Wash Buffer 30 mL, Substrate Reagent 10 mL, dan Stop Solution 10 mL,

4.6 Definisi Operasional

- 1) Profilin *Toxoplasma gondii* rekombinan yang diambil dari *host Escherichia coli* diimpor dari Adipogen Corp, San Diego, USA pada tanggal 26 Januari 2016 dengan cara penyimpanan memakai Blue Ice -20°C dan dalam cairan PBS.
- 2) Jaringan lemak putih diambil dari *retroperitonel/subkutan* tikus wistar yang berumur 4-8 minggu, lalu dicuci dan disentrifuse serta dikultur di media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) yang ditambah beberapa bahan kimia lainnya seperti Na₂CO₃, antibiotik dan lainnya untuk sumber nutrisi dan pelarut (Indra, *et al.*, 2010)
- 3) Kadar NF-κB diukur dengan Rat NF-κB p105 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) Kit dengan nomer catalog E-EL-R0673 yang dibeli di Elabscience .

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Kultur Adiposit

Depo jaringan lemak pada tikus wistar (subkutan/retroperitoneal) dalam kondisi steril disayat dan dimasukkan ke media DMEM, lalu dicuci dengan DMEM dalam cawan petri. Setelah itu jaringan dipotong/dicacah menjadi bagian-bagian kecil yang akan diambil menggunakan pinset dan dicuci lagi di media DMEM dalam cawan petri, lalu memasukkan lemak yang telah dicacah dan dicuci ke tabung 15 mL yang berisi larutan kolagenase tipe I sebanyak 1 mg dan

DMEM sebanyak 7 mL. Jaringan lemak diinkubasi dalam *incubator* selama 20 menit pada suhu 37°C dan CO² 5% sambil dikocok setiap 3 menit. Setelah itu tabung berisi lemak beserta DMEM dan kolagenase tipe 1 disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 7 menit. Hasil dari sentrifuse yang berupa supernatan dibuang dan pellet diambil serta ditambahkan media serum free dan dihomogenisasi, kemudian dilakukan sentrifuse lagi 1500 rpm selama 7 menit. Pellet diambil lagi dan dimasukkan ke dalam *flask* yang telah berisi DMEM serta diinkubasi selama 2 jam dalam *incubator* 37°C dan CO² 5% .

Flask dikeluarkan dari *incubator* ke *laminar flow* dalam kondisi steril untuk diganti medianya dengan DMEM yang mengandung FBS 10% serta dihomogenisasi. Setelah itu kembali diinkubasi dalam *incubator* 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Penggantian media DMEM yang ditambah FBS 10% dilakukan satu kali dalam 2 hari dengan cara mengeluarkan DMEM yang telah dicampur FBS yang lama dari *flask* menggunakan spuit dan menambahkan DMEM dan FBS dengan perbandingan 9:1 untuk dicuci. Setelah itu DMEM dan FBS dikeluarkan lagi dan diganti dengan DMEM dan FBS baru sekitar 8-10 mL. *Flask* ditutup dan kembali dimasukkan ke dalam *incubator*. DMEM dan FBS yang baru dimasukkan ke *flask* dengan menggunakan spuit dengan filter.

Pada minggu kedua dilakukan proses subkultur adiposit dari kultur adiposit utama. *Flask* kembali diganti mediumnya dengan media DMEM yang baru saja lalu setelah dicuci, DMEM dikeluarkan dengan spuit dan diberikan EDTA 3 mL ke dalam *flask* serta digoyangkan sedikit agar merata. Setelah itu *flask* diinkubasi lagi dalam *incubator* selama 7 menit. Kultur adiposit utama yang telah diberi EDTA ditambahkan DMEM 4 mL dan digoyangkan. Cairan DMEM dan EDTA yang bercampur dikeluarkan dengan spuit dan dipindah ke tabung 15

mL yang akan disentrifuse dengan kecepatan 1250 rpm dalam 5 menit sampai terlihat pellet. Supernatan akan dibuang dan pellet akan diberi DMEM dan FBS untuk dimasukkan ke *well*-24 dibagi secara merata. Sebelum pellet dimasukkan, *well*-24 diberi DMEM dan FBS 1 mL untuk tiap *well* yang ada dengan menggunakan spuit dan filter. *Flask* dan *well*-24 kembali diinkubasi dalam *incubator* dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 5%.

Flask dan *well*-24 harus tetap dicuci serta diganti mediumnya setiap dua hari sekali sampai pada minggu ke 4 atau 5 saat sel preadiposit telah berubah menjadi sel adiposit yang banyak dan berdempetan terlihat di mikroskop. Sel-sel adiposit yang telah *mature* dalam *well*-24 tersebut siap untuk diberi perlakuan. Pengamatan melalui mikroskop untuk mencari tanda adanya kontaminasi dilakukan di antara pencucian dan penggantian medium. Bila terdapat tanda kontaminasi awal seperti perubahan warna pada medium atau didapatkan sedikit mikroorganisme yang dapat dilihat di mikroskop maka harus segera diterapi dengan antibiotik atau antifungi sesuai dengan mikroorganisme yang menyebabkan kontaminasi. Kontaminasi yang lama dan tak diterapi akan menyebabkan kematian dari sel adiposit dan harus memulai kembali dari kultur awal serta mengevaluasi dari bahan atau alat sekitar yang dapat berpotensi menyebabkan kontaminasi dan membersihkannya dengan alcohol 95%.

4.7.2 Pemaparan Profilin *Toxoplasma gondii* terhadap Kultur Adiposit

Profilin *Toxoplasma gondii* yang telah digabungkan dengan vektor pembawanya dan diubahkan menjadi *E.coli* DH5α akan mengekspresikan protein profilin *T.gondii* yang akan diperbanyak. Profilin tersebut akan dimasukkan ke dua belas *well* dari 24 *well* subkultur adiposit dalam dosis yang berbeda-beda menggunakan mikropipet. Empat subkultur yang pertama akan mendapat 5μg

profilin, empat subkultur yang kedua akan mendapat 20µg profilin dan yang empat subkultur yang ketiga mendapat 40µg profilin. Setelah itu, kultur diinkubasi lagi dalam waktu 1 hari (24 jam) sebelum diambil selnya untuk diukur menggunakan teknik ELISA.

Cara pengambilan sel adiposit sama dengan cara pembuatan subkultur adiposit, namun berbeda saat setelah disentrifuse. Tiap pellet yang diambil dari tiap *well* yang diberi dosis profilin yang sama akan dimasukkan ke tabung yang sama dan diberi label untuk diukur menggunakan teknik ELISA.

4.7.3 Pembacaan kadar NF-κB dengan ELISA

Persiapan reagen dimulai dengan dilusi 30 mL Wash Buffer terkonsentrasi ke 750 mL Wash Buffer dengan air suling lalu disimpan di suhu 4°C. Setelah itu memulai persiapan standard dengan sentrifuge 10,000×g selama 1 menit dan rekonstitusi Standard menggunakan 1 mL *Reference Standard* dan *Sample Diluent* dengan cara membolak balik setelah dibiarkan berdiri tegak selama 10 menit dan dicampur rata memakai pipet. Rekonstitusi ini menghasilkan 10 ng/mL dan mulai proses dilusi untuk beberapa konsentrasi yaitu 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 dan 0 ng/mL. Dilusi juga dilakukan pada *Biotinylated Detection Ab* dan *Concentrated HRP Conjugate* dengan perbandingan 1:100.

Setelah semua reagen siap, prosedur ELISA dimulai dengan memasukkan 100 µL Standard atau Sample ke tiap well. Well yang kosong diisi dengan *Reference Standard* dan *Sample Diluent* dan inkubasi selama 90 menit dalam suhu 37°C. Setelah itu, mengeluarkan cairan di tiap well tanpa di"washing" dan langsung ditambahkan Biotinylated Detection Ab ke tiap well serta inkubasi selama 1 jam dalam suhu 37°C. Setiap well akan diaspirasi dan dicuci dengan

cara mengisi well dengan Wash Buffer sekitar 350 μL dan didiamkan selama 1-2 menit lalu dikeringkan. Proses pencucian dilakukan selama 3 kali dan setelah pencucian yang terakhir, Wash Buffer yang tersisa diambil dengan aspirasi atau menuangkan secara hati-hati. Setelah kering, HRP Conjugate sebanyak 100 μL dimasukkan ke tiap well dan ditutup serta diinkubasi selama 30 menit dalam suhu yang sama dengan sebelumnya. Pencucian dengan *Wash Buffer* dilakukan lagi sebanyak 5 kali setelah inkubasi.

Reagen yang ditambahkan selanjutnya adalah *Substrate Solution* sebanyak 90 μL ke tiap well dan inkubasi selama 15 menit dengan suhu yang sama dengan sebelumnya. Setelah itu well dikeluarkan dan tidak boleh dikenai cahaya serta ditunggu perubahan warna yang akan terjadi selama tidak lebih dari 30 menit. Pada saat warna telah berubah langsung tambahkan 50 μL *Lof Stop Solution* ke setiap well dan warna akan berubah menjadi kuning dalam sekejap. Pembacaan dengan *micro-plate reader Spectrophotometric* 450 nm yang telah dipersiapkan sebelumnya dengan dinyalakan dan diatur parameter yang akan dibaca. Kalkulasi dari hasil pembacaan dilakukan dengan menggunakan kurva standar yang didasarkan pada *Optical Density* dan konsentrasi sample standar.

4.7.4 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian. Dimulai dari pembuatan kultur adiposit lalu dibuat subkultur dan pemberian profilin (perlakuan) serta pembacaan dengan metode ELISA.

4.8 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$. Kemudian semua data dianalisis dengan statistik parametrik menggunakan One-way ANOVA setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Hipotesis yang ingin diterima (H1) adalah terdapat perbedaan peningkatan kadar NF-κB pada kultur adiposit yang diberi profilin dalam dosis 5 µg, 20 µg dan 40 µg. Hipotesis yang

ingin ditolak (H_0) adalah tidak terdapat perbedaan peningkatan kadar NF- κ B pada kultur adiposit yang diberi profilin dalam dosis 5 μ g, 20 μ g dan 40 μ g. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p > 0,05$). Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Apabila uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji Oneway Anova. Apabila didapatkan $p < 0,05$ dari hasil uji Oneway Anova maka dilakukan uji Turkey dan korelasi Pearson untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan yang signifikan dan hubungan tiap kelompok. Bila didapatkan $p < 0,05$ dalam uji normalitas dan homogenitas maka dilakukan transformasi untuk membuat data menjadi normal distribusinya dan homogen. Jika transformasi tidak berhasil membuat data menjadi normal dan homogen maka digunakan uji nonparametrik yaitu uji Kruskal Wallis dan untuk mencari perbedaan yang signifikan antar kelompok dipakai uji Mann Whitney. Uji korelasi nonparametrik yang digunakan adalah uji korelasi Spearman. Analisa data menggunakan program SPSS dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.