

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode *true eksperimental Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian profilin dari *Toxoplasma gondii* dalam meningkatkan kadar MDA pada kultur adiposit. Metode yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) karena kultur adiposit, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Setelah pemberian profilin, akan dilakukan pengukuran MDA sel adiposit, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan berbagai dosis profilin, untuk mengetahui pengaruh profilin *Toxoplasma gondii* terhadap kadar MDA.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel

Sampel diambil dari kultur adiposit lemak putih tikus wistar. Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Perincian perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Macam-Macam Perlakuan Berdasarkan Kadar Profilin *T. gondii*

Kelompok	Macam Perlakuan
Kontrol Negatif	Kultur adiposit normal
Profilin (I)	Kultur adiposit + Profilin 5µg
Profilin (II)	Kultur adiposit + Profilin 20µg
Profilin (III)	Kultur adiposit + Profilin 40µg

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Adiposit dari tikus wistar berumur 4-8 minggu
2. Adiposit diambil dari jaringan lemak putih tikus wistar
3. Kultur steril

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Kultur tidak steril
2. Kultur terinfeksi mikroorganisme lain

4.2.2.3 Kriteria *Drop Out*

Kultur dinyatakan *drop out* apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti kultur lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat kultur yang sesuai kriteria sampel.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai Oktober 2016.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah profilin dari *Toxoplasma gondii*.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid kultur adiposit.

4.5 Definisi Operasional

1. Kultur adiposit

Kultur adiposit dibuat dari jaringan lemak putih tikus *strain* wistar (*Rattus norvegicus*) yang berumur 4-8 minggu. Jaringan lemak putih diinokulasi pada media yang terdiri dari *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Na_2CO_3 , L-glutamin, dan antibiotika (Indra *et al.*, 2010).

2. Profilin

Profilin *Toxoplasma gondii* diproduksi oleh bakteri *Escherichia coli* yang sudah dimutasi dengan disisipkan gen pengode profilin *Toxoplasma gondii* (Plattner *et al.*, 2008). Untuk memperbanyak dan mengekspresikan gen pengode profilin, RNA *Toxoplasma gondii strain* RH diekstraksi dari takzoit. *Coding region* dari profilin *Toxoplasma gondii* (TgPRF) di-PCR (*Polimerase Chain Reaction*), lalu dipecah memakai *double restriction enzyme* dan diligasikan ke pET30a(+) sebagai vektor dan ditransformasi menjadi *E. coli* DH5 α . Plasmid rekombinan pET301(+)-TgPRF ditransfer ke *E. coli* BL21 dan diinduksi dengan IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) (Yuan *et al.*, 2015). Dosis yang digunakan sebesar 5 μg , 20 μg , dan 40 μg . Profilin diberikan dengan menggunakan mikropipet.

3. Kadar MDA

Kadar MDA dideteksi dari supernatan jaringan lemak yang dihomogenisasi. Kadar MDA diketahui dengan menggunakan teknik *Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) Assay* (Indra, et al., 2010).

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

4.6.1.1 Alat Pembuatan Kultur Adiposit

1. *Laminar flow*
2. *Tissue culture incubator 5% CO₂ atmosphere, 37°C*
3. *Polypropylene steril test tube 15cc dan 50cc*
4. *Flask culture atau plate culture*
5. Cawan Petri
6. Pipet steril
7. Gunting lengan panjang
8. Forceps
9. Nylon mesh/filter mesh 0,2µm
10. Pinset
11. Pipet *disposable*
12. *Pipeting aid*
13. Spuit
14. Botol laboratory
15. Tip
16. Mikroskop *inverted*
17. *Waterbath shaker*

18. Sentrifugator

4.6.1.2 Alat Pemaparan Profilin *Toxoplasma gondii*

1. Mikropipet

4.6.1.3 Alat Pengukuran MDA

1. Tube 2ml
2. Vortex
3. Mikropipet
4. Tip
5. Inkubator
6. Sentrifugator
7. Spektrofotometer
8. Kuvet
9. Tabung Sentrifugasi 15ml

4.6.2 Bahan Penelitian

4.6.2.1 Bahan Pembuatan Kultur Adiposit

1. Jaringan lemak putih tikus wistar berumur 4-8 minggu
2. Media, terdiri dari :
 - a. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)
 - b. Na_2CO_3
 - c. L-glutamin
 - d. Antibiotika
3. Etanol 95%
4. Untuk pematuran sel lemak : insulin, dexametasone
5. Media transport sebagai media pembawa

6. *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebagai sumber nutrisi
7. *Dulbecco Phosphate Buffer Saline* (dPBS) sebagai larutan pencuci
8. *Deionized water* (d_2H_2O) sebagai pelarut
9. Kolagenase tipe I sebagai pemecah matriks sehingga sel target dapat terlepas

4.6.2.2 Bahan Pemaparan Profilin *Toxoplasma gondii*

1. Profilin *Toxoplasma gondii* 5 μ g
2. Profilin *Toxoplasma gondii* 20 μ g
3. Profilin *Toxoplasma gondii* 40 μ g

4.6.2.3 Bahan Pengukuran MDA

1. Jaringan lemak dari kultur adiposit kontrol negatif 10mg
2. Jaringan lemak dari kultur adiposit perlakuan I 10mg
3. Jaringan lemak dari kultur adiposit perlakuan II 10mg
4. Jaringan lemak dari kultur adiposit perlakuan III 10mg
5. Akuades
6. *Trichloroacetic Acid* (TCA) 100%
7. Na Thio 1%
8. HCl 1N
9. PBS

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Kultur Adiposit

Jaringan lemak tikus wistar disayat dalam kondisi steril. Bebaskan semaksimal mungkin dari kapiler darah dan kemudian masukkan dalam media transport. Jaringan kemudian dicuci 2x dengan dPBS, kemudian cuci sekali lagi

dengan media kultur tanpa serum FBS. Cacah jaringan lemak hingga kecil-kecil. Jaringan lalu diambil dengan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi kolagenase tipe I. Kemudian jaringan diinkubasi dalam water bath shaker selama 1-2 jam pada suhu 37°C. Lalu jaringan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 7 menit. Buang supernatan dan ambil pellet kemudian tambahkan medium dan dihomogenisasi. Ulangi kembali sentrifugasi 1000 rpm selama 7 menit. Kemudian ambil pellet dan tambahkan media yang mengandung FBS 10%. Homogenisasi campuran. Lakukan penanaman pada flask atau plate kultur dan inkubasi pada atmosphere lembab mengandung 5% CO₂ suhu 37°C (Indra, *et al.*, 2010).

4.7.2 Pemberian Profilin *Toxoplasma gondii*

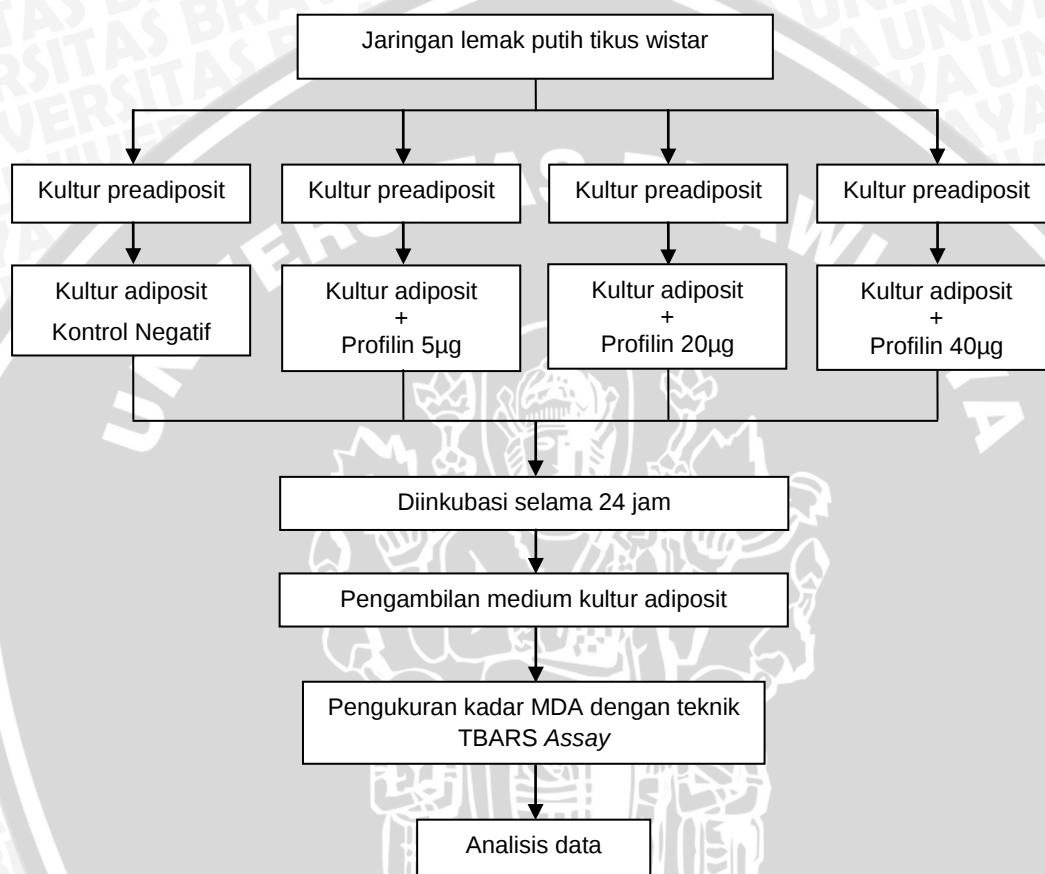
Kultur adiposit yang sesuai dengan kriteria inklusi dikumpulkan. Seperempat dari jumlah total kultur adiposit dibiarkan tanpa perlakuan untuk dijadikan kontrol negatif. Kultur adiposit lainnya diinokulasi dengan profilin *Toxoplasma gondii* masing-masing dengan dosis 5 µg, 20 µg, dan 40 µg. Kultur adiposit kemudian diinkubasi selama 24 jam (Sudjari, *et al.*, 2015).

4.7.3 Pengukuran MDA

Jaringan lemak dari kultur adiposit kontrol negatif dihomogenisasi dengan 100 µl TCA 100% dan 100 µl Na Thio 1%. Tambahkan 1ml PBS. Jaringan lemak kemudian dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100°C. Setelah itu, dinginkan jaringan lemak. Jaringan lemak kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 3500 rpm. Ambil supernatan dari jaringan lemak untuk dijadikan sampel kontrol. Tambahkan 3500ml akuades dan lakukan pembacaan dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 500-600nm. Lakukan hal yang sama

untuk jaringan lemak dari kultur adiposit perlakuan I, II, dan III (Indra, *et al.*, 2010).

4.7.4 Baglan Alur Penelitian



4.8 Pengolahan Data

Data hasil penelitian dianalisis dengan statistik parametrik menggunakan *One-way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p > 0,05$). Data disajikan dalam bentuk mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan

kadar MDA sebagai parameter disfungsi adiposit. Analisis data menggunakan program SPSS dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha=0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p<0,05$.

