

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental post test only control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan profilin *Toxoplasma gondii* dalam menurunkan kadar SOD pada kultur adiposit. Metode yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) karena kultur adiposit dan tempat percobaan, serta bahan penelitian lain bersifat homogen.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, mulai dari bulan Juli hingga Oktober 2016.

4.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini menggunakan kultur adiposit lemak putih tikus *Rattus norvegica* galur Wistar.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah kadar profilin *Toxoplasma gondii* yang diberikan pada kultur adiposit.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah kadar SOD pada kultur adiposit.

4.5 Definisi operasional

4.5.1 Kultur adiposit

Kultur adiposit dibuat dari jaringan lemak putih tikus *Rattus norvegicus* galur wistar yang berumur 4-8 minggu. Jaringan lemak putih dimasukkan ke dalam media yang berisi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Na₂CO₃, L-glutamin, dan antibiotika (Indra, *et al.*, 2010).

4.5.2 Profilin *Toxoplasma gondii*

Profilin *Toxoplasma gondii* didapat dengan menyisipkan gen pengkode profilin *Toxoplasma gondii* ke dalam *Escherichia coli*. Kemudian bakteri *Escherichia coli* yang telah dimutasi tersebut akan memproduksi profilin *Toxoplasma gondii* (Plattner, *et al.*, 2008). Sedangkan gen pengkode profilin diekspresikan dari RNA *Toxoplasma gondii* strain RH yang diekstraksi dari takzoit. Dosis yang digunakan sebesar 5 µg, 20 µg, 40 µg dan diberikan dengan menggunakan mikropipet.

4.5.3 Kadar SOD

Kadar SOD dideteksi dari supernatan kultur sel lemak yang dihomogenisasi. Kadar SOD diukur dengan menggunakan metode manual dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500-600 nm.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Pembuatan kultur adiposit

4.6.1.1 Alat

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

18. Sentrifugator

4.6.1.2 Bahan

1. Jaringan lemak putih tikus wistar berumur 4-8 minggu
2. Media, terdiri dari :
 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)
 - Na_2CO_3
 - L-glutamin
 - 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* ($\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) sebagai pelarut
9. Kolagenase tipe I sebagai pemecah matriks sehingga sel target dapat terlepas

4.6.2 Pemaparan profilin *Toxoplasma gondii* pada kultur adiposit

4.6.2.1 Alat

Mikropipet

4.6.2.2 Bahan

1. Profilin *Toxoplasma gondii* 5 μg
2. Profilin *Toxoplasma gondii* 20 μg

3. Profilin *Toxoplasma gondii* 40 µg

4.6.3 Pengukuran kadar SOD

4.6.3.1 Alat

1. Tube 2 mL
2. Vortex
3. Mikropipet
4. Tips
5. Inkubator
6. Sentrifugator
7. Spektrofotometer
8. Kuvet
9. Tabung sentrifugator 15 mL

4.6.3.2 Bahan

1. Jaringan lemak *fresh* (tanpa formalin)
2. PBS
3. Xantine
4. Xantine oksidase
5. Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Pembuatan kultur adiposit

1. Depo jaringan lemak (periepididimal, retroperitoneal, atau subkutan) disayat dalam kondisi steril, bebaskan semaksimal mungkin dari kapiler darah, kemudian dimasukkan ke dalam media *transport*.
2. Jaringan dicuci dua kali dengan dPBS, kemudian dicuci sekali lagi dengan media kultur tanpa serum FBS, pada tahap ini jaringan lemak dicacah kecil-kecil.
3. Jaringan diambil menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam tabung 15 mL yang berisi larutan kolagenase tipe 1.
4. Jaringan diinkubasi dalam *water bath shaker* selama 1-2 jam pada suhu 37°C, kemudian jaringan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 7 menit.
5. Supernatan dibuang dan *pellet* diambil kemudian ditambahkan media *serum free* dan dihomogenisasi.
6. Dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 7 menit.
7. Supernatan dibuang dan *pellet* diambil kemudian ditambahkan media yang mengandung FBS 10%, dilakukan homogenisasi.
8. Dilakukan penanaman pada *flask* atau *plate kultur*, kemudian diinkubasi pada atmosfir lembab mengandung 5% CO₂ suhu 37°C.

4.7.2 Pemaparan profilin *Toxoplasma gondii* pada kultur adiposit

Empat kultur adiposit yang sesuai dengan kriteria pemilihan sampel dikumpulkan. Tiga dari sampel tersebut masing-masing diberi paparan profilin *Toxoplasma gondii* dengan dosis 5 µg, 20 µg, dan 40 µg. Sedangkan satu sampel kultur adiposit dibiarkan tanpa perlakuan untuk dijadikan kontrol.

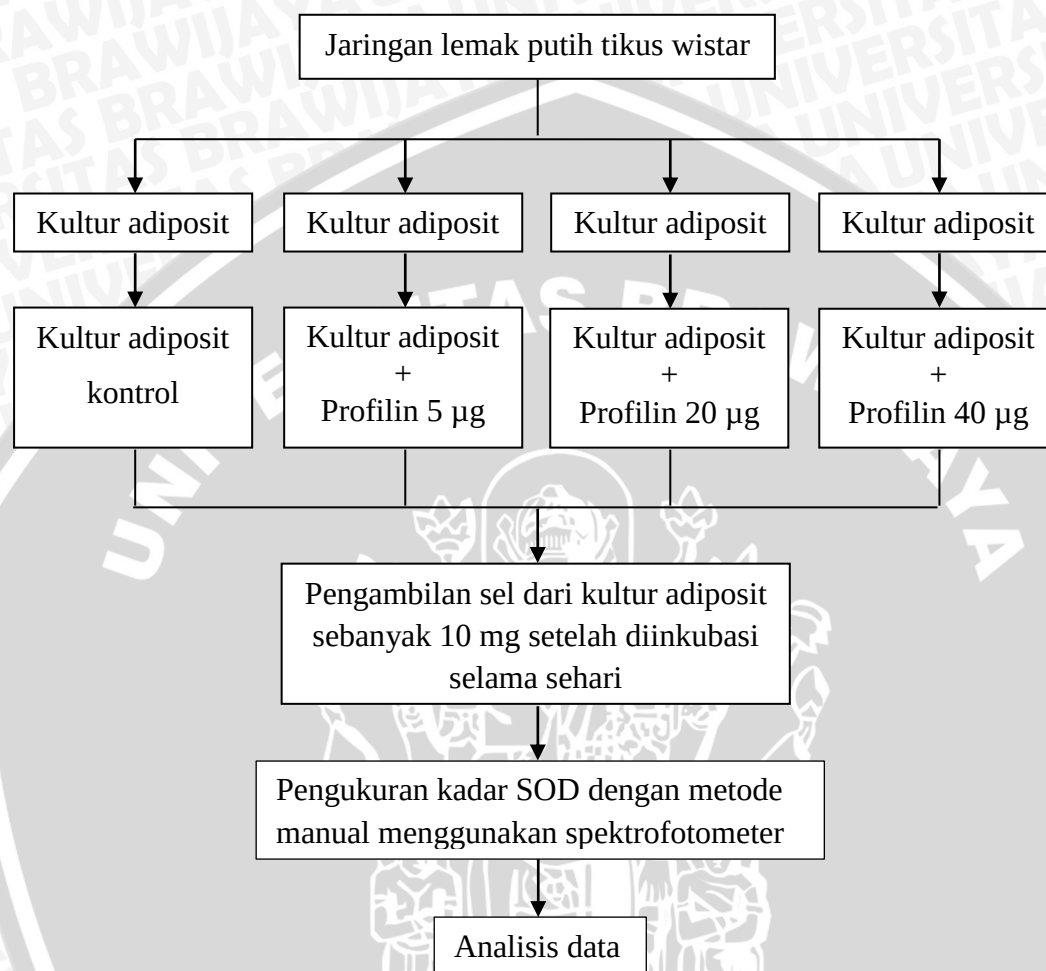
Pemaparan profilin *Toxoplasma gondii* pada kultur adiposit dilakukan dengan menggunakan mikropipet. Kultur adiposit kemudian diinkubasi selama 24 jam.

4.7.3 Pengukuran kadar SOD

1. 10 mg kultur sel lemak dihomogenisasi
2. Dipindahkan ke tabung dan ditambahkan 1 mL PBS
3. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C
4. Disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya
5. Ditambahkan PBS hingga 3500 mL
6. Dilakukan pembacaan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500-600 nm



4.7.4 Bagan Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah uji parametrik *One-way* ANOVA setelah memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas data. 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. Uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen

($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan tiap kelompok. Analisa data menggunakan program SPSS dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.

