

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian ini adalah dengan rancangan eksperimental *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design*, yaitu kelompok perlakuan dan kontrol.

4.2. Sampel Penelitian

4.2.1 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan diperoleh dari rumus Federer dalam buku Hanafiah :

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (7-1) \geq 15$$

$$7n+n-6 \geq 15$$

$$8n \geq 21$$

$$n \geq 2,625$$

$$n \geq 3$$

Keterangan : n : jumlah sampel per kelompok

t : kelompok perlakuan

15 : konstanta

Sehingga besar sampel yang diperoleh minimal adalah 3. Oleh karena itu, dalam percobaan ini digunakan 4 sampel untuk setiap kelompok perlakuan agar data lebih valid.

4.2.2 Kriteria Sampel

Sampel dalam penelitian ini menggunakan sel fibroblas yang telah dikultur dan diinkubasi selama 24 jam yang didapatkan dari laboratorium PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi sampel sebagai berikut.

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Sel fibroblas yang berasal dari pig kidney (ginjal babi)
- b. Sel fibroblas yang telah dikultur selama 24 jam dan berjumlah 80 % (agar data yang didapat valid)

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Sel fibroblas yang mengalami kontaminasi.
- b. Sel fibroblas yang mengalami diferensiasi selama masa inkubasi.

4.3. Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Waktu perendaman pada media simpan air kelapa

Variabel Terikat : Viabilitas sel fibroblas

Variabel Kontrol : Perendaman dalam media eagle

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian di lakukan di PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma), Jalan Ahmad Yani no. 69-70 Surabaya.

4.4.2 Waktu

Penelitian dilakukan selama 5 hari, terhitung dari tanggal 10 Juni 2013 hingga 14 Juni 2013.

4.5. Definisi Operasional

- a. Sel fibroblas vital adalah sel fibroblas dari ginjal babi (pig kidney) yang telah dikultur dan diinkubasi selama 24 jam dan merespon zat pewarna MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium) Assay dalam pembacaan Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) reader. Sel fibroblast dari ginjal babi dapat mewakili sel fibroblast ligament periodontal dikarenakan sel fibroblas adalah sel yang belum terdeferensiasi dan struktur mikroskopis sel fibroblas pada mamalia memiliki persamaan (Marcello,2010).
- b. Ligamen Periodontal adalah sekelompok serat jaringan ikat khusus yang melekatkan gigi ke tulang alveolar.
- c. Avulsi adalah lepasnya gigi secara utuh dari tulang alveolar.
- d. Air kelapa adalah air yang di ambil dari dalam buah kelapa muda yang diperoleh dari pasar kecamatan Tawangmangu.
- e. Perendaman gigi adalah proses perendaman gigi avulsi dalam air kelapa dan eagle selama 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120 jam (Souza et al, 2010).

4.6. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

4.6.1 Alat

Masker, Sarung tangan, Syringe, Petridisk, Kapas, Peralatan untuk pengambilan sampel, Rotomix, Micropipet, Mikroskop Cahaya Inverted, Timer,

Kamera digital, Inkubator, Elisa reader, Exhaust filter. Aluminium foil, Selotip, Gunting, Microplate (96-wellplate).

4.6.2 Bahan

Air kelapa, MTT-Assay, DMSO (Dimetyl sulfoxide), *Phosphate-buffered Salin (PBS)*, *Fetal Bovine serum (FBS)*, VT (*vetsin trypsin*), *Hepes Buffered Solution*, *MEM (Minimum Essential Medium Eagle's)*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Sampel

4.7.1.1 Persiapan Sel Kultur Fibroblas

Sel fibroblas yang telah dirontokkan dengan *Vetsin Trypsin (VT)*, kemudian diambil dengan *micropipet* dari botol penyimpanan kemudian dipindahkan ke dalam *microplate (96-wellplate)* yang sudah diberi media *MEM* dan ditambahkan *Fetal Bovine Serum*. Setelah itu *microplate* diselotip dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

4.7.1.2 Persiapan MEM (Minimum Essential Medium Eagle's)

Media eagle diambil menggunakan *micropipet* sebanyak 100 mikroliter kemudian ditambahkan *HEPES Buffered Solution* untuk menetralkan larutan sehingga pH larutan tidak terlalu asam yang ditempatkan pada botol steril. Kemudian kocok botol tersebut perlahan supaya kedua larutan tersebut tercampur. Kemudian ambil menggunakan *micropipet* dan letakkan larutan Eagle tersebut ke dalam cawan petridis.

4.7.2 Pelaksanaan

4.7.2.1 Penggantian Media kultur dengan Media Simpan

Setelah diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator, *MEM + FBS* diambil menggunakan *micropipet*, kemudian sumuran yang sudah terdapat sel fibroblas yang telah diinkubasi selama 24 jam dibilas menggunakan *PBS (Phosphate Buffered Salin)* untuk menghilangkan sel-sel yang rusak. Setelah dibersihkan, memasukkan media-media simpan ke dalam sumuran masing-masing 4 kolom ke bawah pada setiap variabel waktu media simpan sebanyak 100 mikroliter. Kemudian *microplate* kembali disimpan di dalam inkubator selama 3 jam. Gambaran sel didokumentasikan pada akhir masa inkubasi dengan kamera digital dan mikroskop cahaya *inverted*.

4.7.2.2 Penambahan MTT-Assay dan DMSO

Setelah diinkubasi selama 3 jam, *microplate* diambil kembali kemudian larutan air kelapa diambil kemudian *microplate* dibilas menggunakan *PBS* untuk menghilangkan sel-sel yang rusak. Larutan *PBS* kemudian dibuang dengan menggunakan *micropipet*. Setelah itu dilakukan penambahan larutan *MTT-Assay* dengan menggunakan *micropipet*. Setelah ditambahkan *MTT-Assay* 10 mikroliter, *microplate* kembali diinkubasi selama 2 jam. Kemudian ditambahkan *DMSO* setelah durasi inkubasi berakhir untuk menghentikan kerja *MTT* sebanyak 10 mikro.

4.7.2.3 Rotomix Microplate

Microplate yang telah diinkubasi selama 2-4 jam di ambil dari inkubator, kemudian sumuran *Microplate* yang ditambahkan *DMSO* kemudian diletakkan di

atas Rotomix untuk meratakan larutan dengan cara mengocok secara perlahan selama kurang lebih 5 menit dengan bantuan timer untuk mencatat waktunya.

4.7.2.4 Pembacaan Elisa Reader

Setelah semua perlakuan di atas, *microplate* ditempatkan ke dalam alat ELISA reader yang disambungkan langsung ke dalam komputer untuk dilakukan pembacaan.

4.8 Analisa Data

Data sel fibroblas yang vital didapat dengan perhitungan presentase dengan menggunakan rumus perhitungan persentase:

$$\frac{\text{Nilai absorbansi air kelapa- nilai absorbansi kontrol media}}{\text{Nilai absorbansi kontrol sel – nilai absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Kemudian masing-masing kelompok dilihat distribusi datanya dengan uji *Shapiro Wilk*. Sedangkan uji signifikan jumlah sel fibroblas antar kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan dengan uji two way Anova, yang kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk melihat distribusi perbedaan dari setiap pasang kelompok.

Air kelapa dikatakan efektif apabila dalam selisih perbandingan dengan eagle pada uji LSD menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan atau memiliki perbedaan signifikan yang cukup tinggi.

4.9 Alur Penelitian

