

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:

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

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$3n - n - 3 + 1 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

$$n \geq 9$$

Keterangan: n : jumlah sampel per kelompok

t : kelompok perlakuan

15 : konstanta

Sehingga besar sampel yang diperoleh minimal adalah 9, oleh karena itu dalam percobaan ini digunakan 9 sampel untuk setiap kelompok perlakuan.

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 dari ginjal bayi hamster
- b. Sel fibroblas yang telah dikultur selama 24 jam dan berjumlah 90% (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 obat kumur (*Chlorine dioxide*)

Variabel Terikat : Viabilitas Sel Fibroblas

Variabel Kontrol : Perendaman dalam media eagle

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

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

4.4.2 Waktu

Penelitian dilakukan dalam jangka waktu 2 hari yaitu mulai tanggal 30 Agustus 2016 sampai 31 Agustus 2016.

4.5 Definisi Operasional

- a. Sel fibroblas vital adalah sel fibroblas dari ginjal bayi hamster 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 fibroblas dari ginjal bayi hamster dipilih karena mudah tumbuh dan mudah di sub kultur. Kultur sel terbaik berasal dari sel embrionik atau sel jaringan muda (Nirwana & Soekartono, 2005) selain itu fibroblas adalah sel yang belum terdiferensiasi dan struktur mikroskopis sel fibroblas pada mamalia memiliki persamaan (Marcelo,2010).
- b. Ligamen periodontal adalah lapisan pelekak berupa jaringan ikat yang mengandung serat kolagen yang melekatkan gigi dengan tulang alveolar dan terhubung dengan jaringan ikat gingiva (Vandersall, 2007).
- c. Avulsi adalah cedera traumatik dentoalveolar yang ditandai dengan keluarnya seluruh bagian gigi dari soketnya, dengan kerusakan ligamen periodontal, sementum, tulang alveolar, gingiva dan jaringan pulpa (Gomes, 2009)

- d. Obat kumur *Chlorine dioxide* yang digunakan adalah *Oxyfresh* yaitu produk obat kumur komersial yang berbahan dasar *chlorine dioxide* murni dan terstabilisasi serta memiliki pH netral (Mani S., 2012)
- e. Perendaman gigi adalah proses perendaman gigi avulsi dalam Obat kumur *Chlorine dioxide* dan *Eagle's Medium* selama 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit dan 120 menit (Thomas, 2008).

4.6 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dibutuhkan dalam melakukan penelitian ini adalah:

4.6.1 Alat

- a. Masker
- b. Sarung tangan
- c. *Syringe*
- d. *Petridisk*
- e. Kapas
- f. Peralatan untuk pengambilan sampel
- g. *Shaker*
- h. Mikropipet dan mikropipet *multichannel*
- i. Mikroskop cahaya *inverted*
- j. *Timer*
- k. Kamera digital
- l. Inkubator
- m. *ELISA reader*
- n. *Biosafety Cabinet*
- o. Aluminium foil



- p. Selotip
- q. Gunting
- r. *Microplate* (96-wellplate)

4.6.2 Bahan

- a. Obat kumur *Chlorine dioxide* (*Oxyfresh*)
- b. MTT-Assay
- c. DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*)
- d. *Phosphate-buffered solution* (PBS)
- e. *Bovine serum* (BS)
- f. VT (*Versene trypsin*)
- g. *Hepes buffered solution*
- h. Media *Eagle*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Sampel

4.7.1.1 Persiapan Sel Kultur Fibroblas

Sel fibroblas yang telah dirontokkan dengan *Versene Trypsin* (VT) dipindahkan dari botol penyimpanan ke *petridisk* kemudian menggunakan mikropipet, sebanyak 100 mikroliter dimasukan ke dalam *microplate* (96-wellplate) yang telah diberi media *Eagle* dan *Bovine Serum* 10%. Setelah itu *microplate* diselotip dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

4.7.2 Pelaksanaan

4.7.2.1 Penggantian Media Kultur dengan Media Simpan

Setelah diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator, *Eagle* + *BS* dibuang menggunakan mikropipet, 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, media simpan (obat kumur ClO_2) dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 50 mikroliter. *Microplate* lalu diselotip dan disimpan di dalam inkubator selama 30, 60 dan 120 menit.

4.7.2.2 Penambahan MTT-Assay dan DMSO

Setelah diinkubasi selama 30, 60 dan 120 menit, *microplate* diambil kembali kemudian larutan obat kumur ClO_2 dibuang lalu *microplate* dibilas menggunakan *PBS* (*Phosphate Buffered Salin*). Larutan *PBS* (*Phosphate Buffered Salin*) kemudian dibuang dengan menggunakan mikropipet. Setelah itu dilakukan penambahan *MTT-Assay* 10 mikroliter, *microplate* kembali diinkubasi selama 2 jam. Kemudian ditambahkan *DMSO* (*Dimethyl Sulfoxide*) setelah durasi inkubasi berakhir sebanyak 10 mikroliter.

4.7.2.3 *Microplate Shaker*

Microplate yang telah diinkubasi selama 2-4 jam diambil dari inkubator, kemudian sumuran *microplate* yang ditambahkan *DMSO* (*Dimethyl Sulfoxide*) diletakkan di atas *shaker* 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 yang menggunakan rumus perhitungan presentase:

$$\frac{\text{Nilai absorbansi obat kumur } \textit{Chlorine dioxide} - \text{nilai absorbansi kontrol media} \times 100\%}{\text{Nilai absorbansi kontrol sel} - \text{nilai absorbansi kontrol media}}$$

Kemudian masing-masing kelompok dilihat distribusi datanya dengan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*. Sedangkan uji signifikan jumlah sel fibroblas antar kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan dengan uji *Two Way Anova* dengan interaksi menggunakan sistem Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Difference*) untuk melihat distribusi perbedaan dari setiap pasang kelompok.

Obat kumur ClO_2 dikatakan efektif apabila dalam selisih perbandingan dengan *Eagle* pada uji LSD menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan.

4.9 Alur Penelitian

