

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* *Randomized Post Test Only Control Group Design*, yaitu kelompok perlakuan dan kontrol. Dimana obyek perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu, I, II, III secara random dan diambil datanya setelah dilakukan perlakuan.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah sel fibroblas yang *inactive* yang disimpan dalam *freezer* dan kemudian dilakukan proses inkubasi dan pembiakan. Sel fibroblas ini didapat dari PUSVETMA (Pusat Veterinary Farma) Surabaya.

4.2.1 Jumlah Sampel

Jumlah sampel diperoleh dari rumus (Federer, 1991) :

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

$$(n-1) (4-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan : n : jumlah sampel per kelompok

t : kelompok perlakuan

15 : konstanta

Sehingga besar sampel yang diperoleh minimal adalah 6. Oleh karena itu, dalam percobaan ini digunakan 6 sampel untuk setiap kelompok perlakuan

4.2.2 Kriteria Sampel

Sampel dalam penelitian ini menggunakan sel fibroblas (*inactive*) yang telah dikultur dan diinkubasi selama 24 jam yang didapat di Laboratorium PUSVETMA Surabaya dengan kriteria inklusi dan eksklusi seperti berikut :

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Sel fibroblas yang berasal dari *pig kidney*.
- b. Sel fibroblas yang hidup dengan jumlah 80% yang telah dikultur selama 24 jam.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Sel fibroblas yang mengalami kontaminasi.
- b. Sel fibroblas yang telah mengalami difrensiasi selama inkubasi.

4.3. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas : Tiga macam susu Sapi UHT (Ultra Heat Temperature) yang beredar di pasaran kota Malang.
- b. Variabel Terikat : Persentase sel kultur fibroblas yang hidup.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian dilakukan di Laboratorium PUSVETMA, Jalan Ahmad Yani no. 68-70 Surabaya.

4.4.2 Waktu

Penelitian dilakukan selama 1 minggu, terhitung dari 10 Juni 2013.

4.5 Definisi Operasional

- a. Sel fibroblas vital adalah sel fibroblas yang telah dikultur dan mengalami inkubasi selama 24 jam sebelumnya yang mengeluarkan zat metabolisme yang merespon zat MTT (Methylthiazol Tetrazolium) Assay dengan pembacaan *ELISA* (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) *reader*.
- b. Susu sapi UHT adalah 3 macam susu sapi UHT (susu murni bermerek, susu dengan rasa dan pewarna bermerek, Susu dalam bungkus plastik tanpa merek) yang dapat dibeli di tempat perbelanjaan kota Malang dan disimpan pada lemari pendingin (25° - 20° Celcius).
- c. Perendaman sel fibroblas adalah proses perendaman sel fibroblas dalam berbagai macam susu sapi UHT sebagai media simpan selama 3jam (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, Mikroskop Cahaya (inverted), *Rotomix*, Mikropipet, Inkubator, *Timer*, Kamera Digital, *ELISA* (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) *reader* dan komputer, Exhaust Filter, Aluminium Foil, Selotip, Gunting, *Microplate* (*96-wellplate*)

4.6.2 Bahan

Susu sapi UHT beremerek tanpa pewarna dan rasa, susu sapi UHT bermerek dengan pewarna dan rasa dan susu sapi UHT tanpa merek, MTT (Methylthiazol Tetrazolium) Assay, DMSO (Dimethyl Sulfate Oxide), *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* 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 8 kolom ke bawah pada setiap jenis media simpan sebanyak 100 mikroliter. Kemudian *microplate* kembali disimpan di dalam inkubator selama 3 jam.

4.7.2.2 Penambahan MTT-Assay dan DMSO

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

4.7.2.3 Rotomix *Microplate*

Microplate yang telah ditambahkan DMSO kemudian diletakkan di atas Rotomix untuk meratakan larutan dengan cara mengocok secara perlahan selama kurang lebih 5 menit.

4.7.2.4 Pembacaan Dengan 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 dilakukan dengan perhitungan presentase:

$$\frac{\text{Jumlah absorbansi pada media}}{\text{Jumlah absorbansi pada kontrol sel-jumlah absorbansi pada kontrol media}} \times 100\%$$

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 Anova, yang kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk melihat distribusi perbedaan dari setiap pasang kelompok.

4.9 Alur Penelitian

