

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%

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 putih telur

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 yang telah dikultur dan diinkubasi selama 24 jam dan merespon zat pewarna MTT Assay dalam pembacaan Elisa reader.
- 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. Putih telur adalah putih telur ayam kampung yang didapatkan dari toko swalayan di malang
- e. Perendaman gigi adalah proses perendaman gigi avulsi dalam putih telur 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:

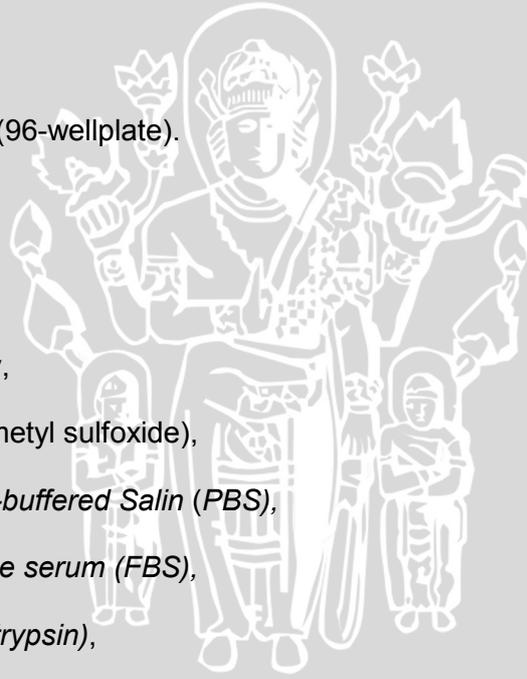
4.6.1 Alat

- a. Masker,
- b. Sarung tangan,
- c. Syringe,
- d. Petridisk,
- e. Kapas,
- f. Peralatan untuk pengambilan sampel,
- g. Rotomix,

- h. Micropipet,
- i. Mikroskop Cahaya Inverted,
- j. Timer,
- k. Kamera digital,
- l. Inkubator,
- m. Elisa reader,
- n. Exhaust filter.
- o. Aluminium foil,
- p. Selotip,
- q. Gunting,
- r. Microplate (96-wellplate).

4.6.2 Bahan

- a. Putih telur,
- b. MTT-Assay,
- c. DMSO (Dimetyl sulfoxide),
- d. *Phosphate-buffered Salin (PBS)*,
- e. *Fetal Bovine serum (FBS)*,
- f. VT (*vetsin trypsin*),
- g. *Hepes Buffered Solution*,
- h. *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 µl. Kemudian

microplate kembali disimpan di dalam inkubator selama 3 jam. Gambaran sel kemudian didokumentasikan pada akhir masa inkubasi dengan kamera digital dan mikroskop cahaya *inverted*.

4.7.2.2 Penambahan MTT-Assay dan DMSO

Setelah diinkubasi selama 2-4 jam, *microplate* diambil dari inkubator kemudian putih telur dan media Eagle dari masing-masing sumuran diambil menggunakan mikropipet. Kemudian *microplate* dibilas menggunakan PBS untuk menghilangkan sel-sel yang rusak. Larutan PBS kemudian dibuang dengan menggunakan mikropipet. Setelah itu dilakukan penambahan larutan MTT-Assay dengan menggunakan *mikropipet*. Setelah ditambahkan MTT-Assay 100 μl , *microplate* kembali diinkubasi selama 2 jam. Kemudian ditambahkan DMSO setelah durasi inkubasi berakhir untuk menghentikan kerja MTT sebanyak 100 μl .

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 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 persentase dengan menggunakan rumus perhitungan persentase:

$$\text{Kehidupan sel (\%)} = \frac{\text{Absorbansi Sampel} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

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.

Putih telur dikatakan efektif apabila dalam perbandingan dengan Eagle pada uji LSD menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan atau tidak berbeda nyata.

4.9 Alur Penelitian

