

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Brawijaya dengan menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Metode ini menggunakan sampel saliva pasien yang sehat atau negatif dan pasien periodontitis. Saliva yang telah ditaruh dalam wadah kemudian diletakkan pada wadah sementara dengan suhu 4<sup>0</sup> C selama 2 jam untuk melindungi saliva dan mencegah pertumbuhan bakteri, setelah itu diletakkan pada lemari pendingin dengan suhu -20<sup>0</sup> C (suhu lemari pendingin pada umumnya). Pengujian ELISA dilakukan ketika jumlah saliva pasien sudah terpenuhi, setelah uji ELISA dilakukan perbandingan antara hasil dari uji ELISA dengan pemeriksaan klinis.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian merupakan pasien control dan pasien periodontitis pada Departemen Peridonsia RSP Universitas Brawijaya. Pemilihan kedua kelompok pasien harus masuk dalam criteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusi untuk pasien normal atau kontrol yang akan diambil salivanya yaitu, pasien sehat dengan tidak adanya kalkulus

dan gingivitis, baik pria maupun wanita, dan tidak terdapat predileksi usia. Kriteria inklusi pasien periodontitis yang akan diambil salivanya yaitu, pasien yang sudah terdiagnosis secara klinis periodontitis, baik pria maupun wanita, dan tidak terdapat predileksi usia.

Kriteria eksklusi kedua kelompok pasien yaitu ibu hamil dan menyusui, serta pasien dengan penyakit sistemik yang menyebabkan xerostomia sehingga dapat menghambat dalam proses pengumpulan saliva.

#### 4.2.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$p(n - 1) \geq 15 \text{ (Solimun, 2001)}$$

keterangan:

p : jumlah ulangan

n : jumlah perlakuan

Dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Pada penelitian ini terdapat dua perlakuan, yaitu yang pertama kelompok orang sehat (non periodontitis) atau pasien yang sedang melakukan kontrol, dan yang kedua adalah kelompok orang yang periodontitis yang pertama kali datang berkunjung ke Rumah Sakit Pendidikan Universitas Brawijaya. Sehingga jumlah sampelnya adalah sebagai berikut :

$$2(n - 1) \geq 15$$

$$N - 1 \geq 7,5$$

$$N \geq 8,5 = 9$$

Dari hasil tersebut didapatkan bahwa setiap satu kelompok penelitian terdiri dari 9 sampel, dan jumlah total sampel sebanyak 18.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Variabel bebas. Yang termasuk dalam variabel bebas:
  - Saliva pasien yang terdiagnosis Periodontitis
  - Saliva pasien normal
- b. Variabel tergantung
  - Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian di lakukan di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Maret – Juni 2014.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat Pengambilan Sampel

1. Botol Steril (tebuat dari plastik atau kaca) untuk menampung saliva pasien
2. Sarung Tangan (Handscone)
3. Masker
4. Corong untuk menempatkan saliva ke botol steril

##### 4.5.2 Alat Penyimpanan Saliva

1. Tabung penyimpanan saliva

2. Lemari pendingin / Tool Box / Tempat Ice
3. Es Batu
4. Termometer

#### 4.5.3 Alat Isolasi sampel

1. Vortex
2. Pipet
3. Bluetip
4. Ependorf
5. Sentrifus Hettic suhu  $4^{\circ}\text{C}$  6000rpm
6. Lemari pendingin dengan suhu  $-40^{\circ}\text{C}$

#### 4.5.4 Alat Uji Elisa

1. *Micro Analyser*
2. Pipet
3. Plate
4. Kertas aluminium foil sebagai membran plate

#### 4.5.5 Bahan Penelitian

- a. Saliva yang didapatkan dari pasien yang sehat dan pasien periodontitis, saliva yang dibutuhkan tiap sampel sebanyak 2-10 ml tergantung dari jumlah yang ingin ditest (Marton, 2004)
- b. Reagen Human  $\text{PGE}_2$  Elisa Kit yang terdiri dari *standard solution*, antibody *PGE 2*, *washing buffer*, larutan kromogen, dan *stop solution*)
- c. PBS
- d. Alat inkubasi untuk ELISA
- e. Aquadest

#### 4.6 Definisi Operasional

1. PGE<sub>2</sub> merupakan protein yang membantu pengaturan dan perkembangan sel-sel efektor imunitas, dan komunikasi antar sel. PGE<sub>2</sub> diproduksi oleh monosit dan fibroblas dengan aktivitas, menginduksi resorpsi tulang dan sekresi metaloproteinase matriks. Jumlah PGE<sub>2</sub> meningkat pada periodontitis.
2. Saliva adalah cairan biologis yang unik dengan peranan penting dalam oral physiology mempunyai peranan penting dalam proses oral dan kesehatan umum maintenance.
3. Periodontitis adalah penyakit pada gusi yang ditandai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat disekitar gigi dan dalam hubungannya pada pembentukan poket periodontal, karena migrasi epitel junctional.
4. ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) merupakan uji serologi digunakan di berbagai laboratorium imunologi. Uji ini memiliki beberapa keunggulan seperti teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis dan memiliki sensitifitas yang cukup tinggi (Lequin, 2005).

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Pengambilan Saliva

Menggunakan metode *Passive drool* yang merupakan metode yang paling efektif dan sering digunakan untuk mengumpulkan saliva dengan mengeluarkan saliva secara pasif ke dalam wadah kecil. Pasien awalnya dipersilahkan duduk, kemudian pasien mengeluarkan

saliva pada tabung yang disediakan, prosedur ini berlangsung selama 30 detik. Metode ini prinsipnya dengan metode *draining* (Salimetrics, 2009).

#### 4.7.2 Penyimpanan Saliva

Pengambilan saliva menggunakan metode *passive droll*, karena sering digunakan peneliti pada umumnya serta waktu yang dibutuhkan hanya 30 detik, sehingga pasien tidak terganggu. Jumlah yang dibutuhkan biasanya 2-10ml tergantung pada komponen yang akan dites. Saliva diletakkan pada suhu 4<sup>0</sup> C selama 2 jam untuk melindungi saliva dan mencegah pertumbuhan bakteri, setelah itu diletakkan pada lemari pendingin dengan suhu -20<sup>0</sup> C (suhu lemari pendingin pada umumnya) (Salimetrics, 2012).

#### 4.7.3. Isolasi Sampel Saliva

Saliva yang telah dimasukkan dalam lemari pendingin, dikeluarkan dan didiamkan agar mencair, saliva mencair, ependorf disiapkan kemudian diberikan tanda sesuai dengan urutan sampel. Selanjutnya, ketika saliva telah mencair, saliva dimasukkan ke dalam ependorf dan diberi PBS dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan pencampuran dengan vortex selama 15 detik. Saliva yang telah dicampur dengan PBS kemudian disentrifugasi pada suhu 4<sup>0</sup> C 6000rpm selama 15 menit, apabila telah selesai dilakukan pengambilan cairan supernatant dengan menggunakan pipet kemudian dimasukkan dalam ependorf baru, yang selanjutnya disimpan pada suhu -40<sup>0</sup> C didiamkan selama kurang lebih 24 jam untuk melakukan Uji Elisa.

#### 4.7.4. Uji ELISA

Prosedur pemeriksaan ELISA yaitu pertama alat standar dari sampel-sampel yang ada disiapkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi selesai kemudian dilakukan pembersihan, kemudian diwarnai secara standar dan sampelnya menggunakan kromagen. Setelah itu di inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C dan dijauhkan dari pencahayaan. Setelah itu tambahkan larutan stop lalu warnanya yang semula biru berubah menjadi kuning, lalu dilakukan pengukuran menggunakan *micro analyser* dan kemudian keluar hasil dari penelitian.

#### 4.7.5 Analisis ELISA

Sebelum analisis menggunakan ELISA, saliva terlebih dahulu diberi reagen untuk mengetahui aktifitas dari sitokin PGE<sub>2</sub>. Setelah dicampur dengan reagen ditetaskan pada kertas analisis menggunakan pipet kemudian dimasukkan ke alat ELISA dan ditunggu beberapa saat, lalu keluar hasil analisis ELISA yang mencantumkan hasil penghitungan.

#### 4.7.6 Analisis Data

Untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan yang bermakna pada pengamatan setiap variable berdasarkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dan waktu pengamatan maka data dianalisis dengan menggunakan uji *Independent t-test* dan *Uji Korelasi-Regresi* yang nantinya dibandingkan dengan pemeriksaan klinis dari pasien periodontitis sehingga dapat menunjukan tingkat keparahan yang bermakna.

### 4.8 Alur Penelitian



