

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan model *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan penurunan tingkat ekspresi α -SMA pada kultur sel myofibroblas jaringan soket kontraktur.

4.2 Sampel Penelitian

Perhitungan besaran sampel penelitian berdasarkan rancangan penelitian eksperimental, dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

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

dengan t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini didapatkan 3 kelompok penelitian, maka jumlah replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 9 kali. Dengan demikian banyaknya sampel yang diperlukan pada penelitian ini adalah sebanyak 27 sumuran untuk keseluruhan sampel penelitian. Untuk jumlah lapang pandang yang diamati, minimal dilakukan 3 kali foto.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam waktu 3 bulan. Subyek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3 sampai 5, dikarenakan pasien dengan derajat tersebut adalah pasien yang diindikasikan untuk dilakukan tindakan rekonstruksi soket. Kultur

jaringan dan pemeriksaan parameter dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1 Kriteria Inklusi

Subyek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3 sampai 5 dengan indikasi operasi rekonstruksi soket.

4.4.2 Kriteria Eksklusi

- Penyebab soket anoftalmia bukan kongenital, trauma kimia, api atau kehilangan jaringan yang banyak.
- Kultur mengalami kontaminasi jamur (fungi), mikroorganisme lain, maupun bahan kimia lainnya.

4.5 Variabel Penelitian

- Variabel bebas: subkultur
- Variabel tergantung: tingkat ekspresi α -SMA

4.6 Definisi Operasional

1. Soket kontraktur adalah kontraktur pada bagian forniks kelopak mata atas maupun bawah atau pada keduanya sekaligus, disertai pembentukan sikatrik yang menyebabkan protesa tidak terpasang dengan baik, bahkan sama sekali tidak dapat menggunakannya.
2. Kultur sel fibroblas manusia adalah biakan sel – sel fibroblas yang didapatkan dari jaringan tenon manusia yang diperoleh dari operasi rekonstruksi soket kontraktur di kamar operasi RSSA dan ditanam pada media kultur.

3. Subkultur jaringan kontraktur manusia adalah biakan dari sel fibroblas/myofibroblas jaringan soket kontraktur yang diambil dari pasien soket kontraktur derajat 3 sampai dengan 5.
4. *Growth Factor* yang diperiksa adalah TGF- β (*transforming growth factor- β*), yaitu *growth factor* yang berperan penting dalam regulasi respon imun, proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel, proses penyembuhan luka, hemostasis vascular, serta fibrosis. TGF- β yang digunakan merupakan TGF- β 1 manusia rekombinan produk dari Abcam dengan nomor register ab50036. Pada kelompok kontrol, dosis TGF- β yang diberikan adalah 10ng/mL.
5. α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) adalah protein yang meningkatkan kontraktilitas sel dan membentuk fenotip myofibroblas. Tingkat ekspresi α -SMA diukur dengan antibodi anti α -SMA [1A4] dengan nomor register ab7817 dari merk dagang Abcam. Pengukuran dilakukan dengan metode immunofluorescence.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat:

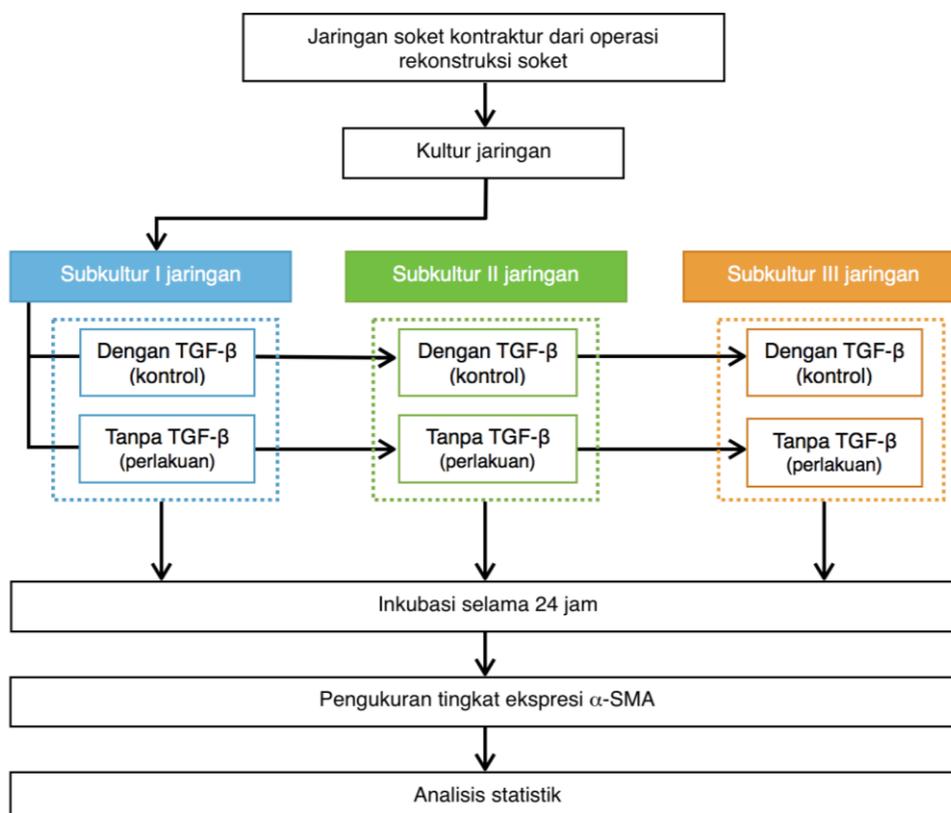
- *Hood* kultur sel (*laminar-flow hood* atau *biosafety cabinet*)
- Inkubator (disarankan inkubator lembab CO₂)
- *Water bath*
- Setrifus
- Pendingin dan *freezer* (-20°C)
- *Cell counter*
- Mikroskop *inverted*
- Kontainer *cryostorage* atau *freezer* Nitrogen (N₂) cair

- Sterilisator (seperti autoklaf)

4.7.2 Bahan Penelitian:

- Kultur sel fibroblas (myofibroblas) jaringan soket kontraktur, yaitu jaringan tenon diambil dari soket kontraktur pasien yang dilakukan operasi rekonstruksi soket
- Collagenase II (invitrogen, Carlsbad, CA)
- Falcon T-25 flasks (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Bedford, MA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Serum fetal sapi (*Fetal Bovine Serum* atau FBS)
- Antibiotik-antimikroba (Gibco-Carlsbad, CA)
- Trypsin 0,05%
- Phosphate-buffered saline

4.8 Alur Penelitian



4.9. Perlakuan:

- Kultur dan subkultur jaringan di media biakan berlaku sebagai perlakuan
- Pemberian TGF- β bertujuan sebagai kontrol, bukan sebagai perlakuan

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Pengambilan Sampel

Jaringan tenon fibrosis dari soket kontraktur pasien didapatkan dari hasil diseksi jaringan fibrosis saat operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis. Jaringan fibrosis hasil diseksi yang biasanya dibuang ini kemudian disimpan dan dilakukan kultur dan subkultur. Tindakan ini memenuhi standar deklarasi Helsinki dan disetujui oleh komisi etik RS dr. Saiful Anwar Malang. Pengambilan sampel dan kultur adalah sebagai berikut:

- Jaringan tenon dipotong – potong sebesar 1 mm³ menggunakan pisau bedah ukuran 11. Collagenase II (invitrogen, Carlsbad, CA) sebanyak 750 U/ml ditambahkan pada potongan fragmen tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam.
- Ambil campuran tersebut dengan menggunakan jarum 18G, 21G, dan 23G, sebanyak 4 kali dari tiap – tiap jarum, kemudian sampel di sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit.
- Sel diletakkan pada media Falcon T-25 flasks (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) dengan 5 ml DMEM media kultur. Media kultur mengandung 10% FBS dan Antibiotik-antimikroba (Gibco-Carlsbad, CA)
- Sel kultur disimpan pada suhu 37°C pada inkubator yang dijaga kelembapannya dengan 5% CO₂.
- Media diganti setiap 3 hari sampai dengan fibroblas tumbuh dengan baik. Jika fibroblas telah tumbuh dengan baik, kemudian dilakukan sub kultur

dengan 75 cm² Falcon T-75 flasks (Becton-Dickinson, Bedford, MA) menggunakan trypsin 0,05% (Gibco) dalam larutan garam sulfat.

- Sub kultur ditempatkan pada media DMEM bebas serum tanpa kandungan *phenol red-containing 0,1% bovine albumin serum* (Sigma, St. Louis, MO) dan antibiotik.
- Sub kultur dilakukan tiga kali.

4.10.2 Kultur dan Subkultur

1. Resuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*.
2. Ambil 300 µl panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. Tambahkan 5-7 ml MK dan resuspensi kembali.
3. Tuang sel ke dalam *dish* baru yang telah disiapkan. Penanaman secara homogen dan amati kondisi sel.
4. Inkubasi semalam dan ganti MK jika medium sudah berwarna merah pucat.
5. Ambil sel dari inkubator CO₂, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen.
6. Buang media dengan menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steril.
7. Cuci sel diulang 2 kali dengan PBS (volume PBS adalah ± 1/2 volume media awal).
8. Tambahkan tripsin-EDTA (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
9. Tambahkan media ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin.
10. Amati keadaan sel di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
11. Transfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam conical steril baru.
12. Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi..

4.10.3 Pemeriksaan Tingkat Ekspresi α -SMA Menggunakan Immunofluorescence

Immunofluorescence adalah bagian dari metode yang telah dikembangkan untuk memperlihatkan ekspresi protein spesifik pada sel dengan prinsip ikatan antigen-antibodi dan menggunakan pendaran *fluorochrome*. *Fluorochrome* adalah senyawa *fluorescence* mengikat antibodi primer secara langsung.

4.10.4.1 Alat:

- Mikropipet 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l
- Pinset
- Cover slip
- *Slide glass*
- *Enam well plate*

4.10.4.2 Bahan:

- Alkohol 70% dingin
- PBS 1x
- 1% BSA dalam PBS
- DAPI
- 1st Antibody
- 2nd Antibody (FITC dan Alexa 488 anti-mouse/anti-rabbit)

4.10.4.3 Prosedur

1. Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel yang diinginkan, misalnya 1/2 IC₅₀ untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l/well.
2. Ambil *well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂.

3. Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
4. Cuci sel 1 x dengan 500 μ L PBS 1x
5. Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
6. Masukkan sampel sebanyak 1000 μ L ke dalam sumuran
7. Masukkan 1000 μ L MK untuk kontrol sel (2 kontrol sel).
8. Inkubasi di dalam inkubator CO₂
9. Amati kondisi sel setelah waktu inkubasi
10. Fiksasi sel menggunakan 500 μ l etanol 70% dingin selama 15 menit pada suhu ruang.
11. Buang etanol 70 % dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
12. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
13. Inkubasi sel dengan 50 μ L blocking serum (1% BSA in PBS), inkubasi 30 menit
14. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
15. Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab primer, inkubasi semalam di 4^oC
16. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
17. Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab sekunder (FITC/Alexa), inkubasi 1 h di suhu ruang dalam wadah gelap
18. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap
19. Tambahkan 50 μ l DAPI 1 μ g/ml, inkubasi 10 menit di suhu ruang dalam wadah gelap
20. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap.

21. Ambil dan letakkan *cover slip* di atas *object glass*, tetesi dengan lem (*mounting media: entelen*). Tutup *cover slip* dengan *cover glass*.
22. Amati dengan mikroskop imunofluorosens.
FITC: Ex 494 nm, em 518 nm
DAPI: Ex 341 nm, em 452 nm
23. Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi.

4.11 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis sebagai data kelompok dengan menghitung rata-rata (*mean*) dan standard deviasi tiap kelompok dan diuji menggunakan uji statistik yang sesuai. Sebelum pengujian, normalitas dan homogenitas data diuji terlebih dahulu. Data yang dipergunakan untuk mengambil kesimpulan adalah data kelompok dengan nilai uji normalitas *saphiro-wilk* bernilai $>0,05$ dan homogen dengan nilai uji *homogeneity of variance* $>0,05$. Selanjutnya jika data subkultur I, II, III, dan kelompok kontrol merupakan data yang normal dan homogen, dilakukan uji *One way Anova* dan LSD dengan kebermaknaan < 0.05 . Jika data tidak normal, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Untuk menguji hubungan antara masing-masing kelompok subkultur I, II, III dengan kelompok yang diberi perlakuan TGF- β , dilakukan uji *Independent T-Test*.

4.12 Etika Penelitian

Ethical clearance penelitian ini diajukan pada Komite Etik RS dr. Saiful Anwar Malang.