

# UJI SITOTOKSISITAS ANTIBODI MONOKLONAL *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa PASCA PENYIMPANAN

## SKRIPSI



Oleh:

**Sekar Putri Timur**  
020710138

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN  
SURABAYA  
2011**



**UJI SITOTOKSISITAS ANTIBODI MONOKLONAL**  
***Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa PASCA PENYIMPANAN**

**SKRIPSI**

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Menyelesaikan  
Pendidikan Dokter Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Airlangga Surabaya

Oleh:

**Sekar Putri Timur**  
**020710138**

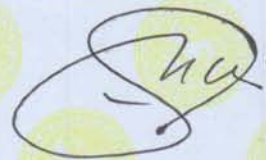
Menyetujui

Pembimbing Utama



**(Markus Budi Rahardjo, drg., M.Kes.)**  
NIP. 195405101981031010

Pembimbing Serta



**(Sidarningsih, drg., M.Kes.)**  
NIP. 196004091986012001

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN**  
**SURABAYA**  
**2011**

## **PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI**

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SKRIPSI ini telah diuji pada tanggal 5 januari 2011

### **PANITIA PENGUJI SKRIPSI**

1. Dr. Theresia Indah Budi, drg., M.Kes (ketua penguji)
2. Markus Budi Rahardjo, drg., M.Kes (pembimbing utama / anggota)
3. Sidarningsih, drg., M.Kes (pembimbing serta / anggota)
4. Dr. Retno Indrawati, drg., M.Si (anggota)
5. Yuliati, drg., M.Kes (anggota)



## UCAPAN TERIMA KASIH

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas Antibodi Monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa Pasca Penyimpanan” tepat pada waktunya. Penyusunan skripsi ini digunakan sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Dengan segenap ketulusan hati, saya juga mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. R.M. Coen Pramono, drg., SU., SpBM (K). selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.
2. Prof. Dr. Jenny Sunariani, drg., M.S. selaku kepala Departemen Biologi Oral. Terima kasih telah memberi ijin untuk pembuatan skripsi.
3. Markus Budi Rahardjo, drg., M.Kes selaku pembimbing pertama. Terima kasih atas doa, waktu, bimbingan dan dorongan yang diberikan kepada penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi.
4. Sidarningsih, drg., M.Kes selaku pembimbing kedua. Terima kasih atas doa, waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi.

5. Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes, Dr. Retno Indrawati, drg., M.Si,  
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
dan Yuliati, drg., M.Kes selaku panitia penguji skripsi. Terimakasih atas kritik dan saran yang membangun demi perbaikan penulisan skripsi ini.
6. Dr. Indah Listiana K, drg. M.Kes dan Anis Irmawati, drg., M.Kes selaku konsultan. Terima kasih atas saran dan masukan kepada penulis.
7. Kedua orang tua penulis, Suwandi Ratno Sumarto dan Padmi Sukamti yang selalu mendoakan dan mendukung setiap saat. Saudara kandung penulis, Mery dan Galih, terima kasih atas kasih sayangnya.
8. Drh. Erna, selaku staf Pusvetma Surabaya. Terima kasih atas bimbingannya selama penulis melakukan penelitian di Pusvetma Surabaya.
9. Mbak Nur, Mas Eta, dan Pak Heri selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia. Terima kasih bantuannya selama ini.
10. Berlian B, Rizki P.N, dan teman-teman ranger. Terima kasih atas dukungannya selama ini.
11. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menerima saran dan kritik yang membangun demi perbaikan skripsi ini. Semoga penulisan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya keluarga besar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Surabaya, Januari 2011

Penulis



(CYTOTOXICITY TEST OF MONOCLONAL ANTIBODIES  
*Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa AFTER STORAGE)

ABSTRACT

**Background.** Based on Ministry of Health (2009), dental caries prevalence rate in Indonesia reached 89%. New alternative in caries prevention using monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa that specific to cell surface protein 67 kDa of *S. mutans*. In 2001, Soerodjo et al produce monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa with class type IgA, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>3</sub> and have been storage in freezer with temperature -20<sup>0</sup>C from 2001 until 2010 at Pusvetma, Surabaya. As one of the dental health products, monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa should have not toxic, and have properties biocompatibility. Long storage can affect change in the nature of the monoclonal antibodies. **Purpose.** The aim of this research is to determine the effect of cytotoxic fibroblast cells have been induced with monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa class of IgA, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>3</sub> after storage. **Method.** Cytotoxicity test of monoclonal antibodies 1 (c) 67 kDa used MTT assay. Measurement of cytotoxicity was a optical density or absorbent. Value of absorbent in microplate showed the number of living cells in media culture. **Result.** IgA had lowest average optical density be compared with IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>. These results suggested that monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa class type of IgA had lowest number of living cells be compared with IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>. **Conclusion.** Monoclonal antibodies *S. mutans* 1 (c) 67 kDa class type of IgA has toxic properties be compared to IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> after storage.

**Keywords :** *S. mutans*, monoclonal antibodies, cytotoxicity, MTT assay, antibodies storage.



	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PANITIA PENGUJI SKRIPSI</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB 1      PENDAHULUAN</b>	
1.1    Latar belakang .....	1
1.2    Rumusan Masalah .....	3
1.3    Tujuan penelitian .....	3
1.3.1    Tujuan Umum .....	3
1.3.2    Tujuan Khusus .....	4
1.4    Manfaat penulisan .....	4
<b>BAB 2      TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Streptococcus mutans</i> .....	5
2.1.1    Klasifikasi <i>S. mutans</i> .....	5



2.1.2	Sifat <i>S. mutans</i> .....	6
	IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA	
2.1.3	Morfologi koloni <i>S. mutans</i> .....	6
2.2	Antibodi Monoklonal.....	8
2.2.1	Antibodi Monoklonal <i>S. mutans</i> 1 (c) 67 kDa .....	9
2.3	Uji Sitotoksisitas.....	10
2.4	<i>MTT Assay</i> .....	11
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1	Kerangka Konseptual .....	13
3.2	Hipotesis Penelitian .....	14
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN</b>	
4.1	Jenis penelitian.....	15
4.2	Sampel Penelitian.....	15
4.3	Identifikasi Variabel Penelitian .....	15
4.3.1	Variabel Bebas .....	15
4.3.2	Variabel Tergantung .....	15
4.3.3	Variabel Terkendali .....	15
4.4	Definisi Operasional Penelitian.....	16
4.4.1	Antibodi Monoklonal <i>S.mutans</i> 1 (c) 67 kDa .....	16
4.4.2	Penyimpanan -20 <sup>0</sup> C (Periode 2001-2010) .....	16
4.4.3	Uji Sitotoksisitas .....	16
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	16
4.5.1	Alat Penelitian .....	16



4.5.2	Bahan Penelitian .....	17
	IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA	
4.6	Tempat Penelitian .....	17
4.7	Prosedur Penelitian .....	17
4.7.1	Persiapan Antibodi Monoklonal <i>S.mutans</i> 1 (c) 67 kDa .....	17
4.7.2	Persiapan sel fibroblas .....	18
4.7.3	Pelaksanaan Eksperimen .....	18
4.8	Alur penelitian .....	20
4.9	Analisis data .....	20
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>21</b>
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>25</b>
<b>BAB 7</b>	<b>SIMPULAN DAN SARAN</b>	
7.1	Simpulan .....	30
7.2	Saran .....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>31</b>

## DAFTAR TABEL

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

### Halaman

Tabel 5.1 Hasil rerata, standar deviasi dan persentase sel hidup uji sitotoksitas antibodi monoklonal <i>Streptococcus mutans</i> 1 (c) 67 kDa terhadap sel fibroblas BHK-21 .....	21
Tabel 5.2 Hasil uji HSD sitotoksitas antibodi monoklonal <i>Streptococcus mutans</i> 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG <sub>1</sub> , dan IgG <sub>3</sub> .....	24



# DAFTAR GAMBAR

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 <i>S. mutans</i> .....	7
Gambar 2.2 Struktur dinding sel <i>S. mutans</i> .....	8
Gambar 2.3 Pembuatan antibodi monoklonal .....	9
Gambar 5.1 Grafik rerata sel hidup uji sitotoksitas antibodi monoklonal .....	22

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Absorbansi uji sitotoksitas .....	35
Lampiran 2 Perhitungan % jumlah sel hidup.....	36
Lampiran 3 Uji Normalitas ( <i>Kolmogorov – Smirnov Test</i> ) .....	38
Lampiran 4 Uji <i>Oneway Annova</i> .....	39
Lampiran 5 Perhitungan <i>sampke size</i> .....	44
Lampiran 6 Alat dan bahan .....	46





## 1.1 Latar Belakang

Kesehatan gigi dan mulut menjadi faktor penting dalam menunjang kesehatan tubuh secara menyeluruh. Rongga mulut merupakan tempat dan lingkungan yang baik untuk pertumbuhan bakteri karena memiliki suasana dengan kelembaban tinggi dan terdapat saliva yang kompleks yang dapat digunakan sebagai nutrisi bagi bakteri. Kelainan pada rongga mulut akan mempengaruhi fungsi fisiologis tubuh (Sundoro, 2001). Salah satu kelainan yang dapat mempengaruhi fungsi fisiologis tubuh adalah karies gigi.

Karies adalah suatu penyakit yang disebabkan interaksi antara *host* (gigi/pertahanan tubuh), *agent* (bakteri), dan *environment* (diet). Walaupun penyebabnya multifaktor, namun dapat dikatakan bahwa pemicu terjadinya karies gigi adalah bakteri kariogenik *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), terutama *serotipe c* (Roeslan, 2009). Di Indonesia, prevalensi karies masih tergolong tinggi. Menurut data Departemen Kesehatan tahun 2009 menyebutkan bahwa 89% masyarakat Indonesia mengalami karies gigi (Zatnika, 2009).

Selama ini banyak upaya pencegahan karies gigi yang telah dilakukan, diantaranya dengan memperbaiki nutrisi, mengurangi konsumsi diet kariogenik, meningkatkan kebersihan mulut, pemberian fluor sistemik atau topikal. Dan pemakaian pelapis fisura dengan bahan adhesif, namun semua itu belum memberikan hasil yang baik, hal tersebut tercermin pada angka prevalensi karies yang masih tinggi (Roeslan, 2009). Saat ini sedang dikembangkan suatu pilihan

pengecahan terhadap karies gigi dengan menggunakan antibodi monoklonal.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Antibodi monoklonal merupakan antibodi yang diproduksi dari satu klon sel yang hanya menghasilkan satu kelas imunoglobulin (Artama, 1992).

Antibodi monoklonal yang digunakan untuk antikaries adalah antibodi monoklonal *S.mutans* 1(c) 67 kDa yang spesifik terhadap antigen permukaan sel (SA I/II) dari *S.mutans*. Peranan protein 67 kDa di dinding *S.mutans* adalah mampu melekat pada struktur enamel gigi dan bakteri lain untuk mempermudah kolonisasi bakteri dalam rongga mulut yang merupakan awal terjadinya karies gigi. Pada tahun 2001, Soerodjo dkk memproduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dengan tipe kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> di Pusvetma, Surabaya. Antibodi tersebut juga telah dilakukan formulasi dengan pasta gigi dengan dan tanpa deterjen, kemudian didapatkan hasil formulasi bahan yang dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan menurunkan jumlah koloni *S. mutans* secara in vitro (Devijanti, 2003).

Sebagai salah satu produk kesehatan gigi, antibodi monoklonal *S.mutans* 1(c) 67 kDa harus memenuhi syarat-syarat bahan yang digunakan dalam kedokteran gigi, antara lain tidak toksik, dan memiliki sifat biokompatibilitas. Secara umum, bahan-bahan tersebut harus tidak mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik (Van Noort, 2006). Pada penelitian secara in vitro dengan *MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) assay* didapatkan hasil bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa tidak bersifat toksik dan aman digunakan dengan urutan presentase kematian sel yang paling rendah adalah IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> (Devijanti, 2006).



Suatu bahan yang telah dilakukan penyimpanan lama akan mempengaruhi sifat fisik dan biologis suatu bahan sehingga hal tersebut akan mempengaruhi fungsi reaksi metabolisme suatu bahan yang akan menimbulkan suatu efek merugikan termasuk toksik (Pacific, 2010). Demikian dengan antibodi monoklonal *S. mutans* 1(c) 67 kDa yang telah dilakukan penyimpanan selama hampir 10 tahun, juga akan menimbulkan perubahan sifat fisik dan biologis sehingga mempengaruhi biokompatibilitasnya. Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan uji sitotoksitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa sehingga pemakaian antibodi tersebut dalam aplikasinya dapat dipertanggungjawabkan, dan tidak mengiritasi jaringan di rongga mulut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pasca penyimpanan suhu -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010) menimbulkan efek sitotoksik terhadap sel fibroblas (BHK-21) ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek sitotoksik sel fibroblas (BHK-21) setelah diinduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1(c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pasca penyimpanan suhu -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010).

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Untuk mengetahui jumlah sel fibroblas (BHK-21) yang hidup setelah diinduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1(c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pasca penyimpanan -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010).

### **1.4 Manfaat Penulisan**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi tentang sitotoksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa pasca penyimpanan, yang selanjutnya dapat digunakan sebagai acuan referensi dalam aplikasi pencegahan karies.

## **2.1 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)**

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) termasuk famili *Streptococcaceae* dan merupakan bakteri kariogenik yang merupakan penyebab utama terjadinya karies gigi. Rongga mulut adalah habitat utama yang mampu menimbulkan kolonisasi bakteri pada permukaan gigi. *S. mutans* mampu memetabolisme karbohidrat sampai menjadi asam sehingga pH saliva dan pH plak mengalami penurunan hingga dibawah titik kritis yang pada akhirnya dapat menyebabkan larutnya enamel. Selain itu juga mampu mensintesis glukon dari sukrosa dan glukon yang terbentuk merupakan massa lengket, pekat dan tidak mudah larut serta berperan dalam perlekatan pada permukaan gigi (Lehner, 1992).

Menurut Soerodjo (1989), beberapa faktor yang menyebabkan *S. mutans* dianggap mempunyai peranan penting dalam terjadinya karies gigi, antara lain kemampuannya dalam membuat asam lebih cepat pada sukrosa dengan pH lebih rendah daripada *Lactobacillus*. Selain itu juga mampu menghasilkan pH optimum 5,5 yang diperlukan untuk demineralisasi gigi. Disebutkan juga bahwa *S. mutans* bersifat asidogenik (mempunyai kecepatan yang tinggi dalam menghasilkan asam), sehingga dapat menyebabkan demineralisasi *hidroksi apatite*.

### **2.1.1 Klasifikasi *S. mutans***

Menurut Bergey dalam Capuccino (1998), klasifikasi *S. mutans* adalah sebagai berikut :

*Kingdom* : *Monera*



*Divisio* : Firmicutes

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

*Class* : Bacilli

*Order* : Lactobacilales

*Family* : Streptococcaceae

*Genus* : Streptococcus

*Species* : Streptococcus mutans

### 2.1.2. Sifat *S. mutans*

Menurut Panjaitan (1995), *S. mutans* mempunyai sifat-sifat tertentu yang berperan penting dalam proses karies gigi, yaitu :

1. *S. mutans* memfermentasikan berbagai jenis karbohidrat menjadi asam sehingga mengakibatkan penurunan pH.
2. *S. mutans* membentuk dan menyimpan polisakarida intraselular dari berbagai jenis karbohidrat, yang selanjutnya dapat dipecahkan kembali oleh bakteri tersebut sehingga dengan demikian akan menghasilkan asam terus-menerus.
3. *S. mutans* mempunyai kemampuan untuk membentuk polisakarida ekstraselular (dekstran) yang menghasilkan sifat-sifat adhesif dan kohesif plak pada permukaan gigi.
4. *S. mutans* mempunyai kemampuan untuk menggunakan glikoprotein dari saliva pada permukaan gigi.

### 2.1.3. Morfologi *S. mutans*

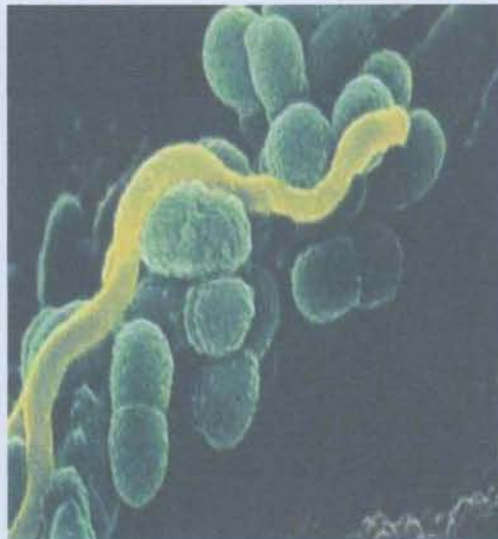
Secara mikroskopis, *S. mutans* merupakan gram positif, tidak bergerak aktif, tidak membentuk spora, dan mempunyai susunan rantai dua atau lebih. Berbentuk bulat dengan diameter 0,5-0,7 mm. Kadang bentuknya mengalami pemanjangan

menjadi batang pendek, tersusun berpasangan atau membentuk rantai pendek.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Susunan rantai panjang diperoleh *S. mutans* berada dalam media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) (Bachtiar, 1997).

Media yang dapat digunakan untuk membiakkan *S. mutans* adalah *Tryptone Yeast Cysteine* (TYC) dan media agar darah. Menurut Soerodjo (1989), gambaran koloni bakteri tersebut yaitu ukuran koloni dengan diameter 1-5 mm, permukaan koloni berbutir kasar, licin, menyerupai bunga kasar dengan pusat menyerupai kapas. Konsistensi koloni keras dan sangat lekat, warna koloni seperti salju yang membeku, agak buram mengkilat (*opaque*), kuning buram dengan lingkaran putih. Sedangkan tepi koloni tidak teratur, bulat teratur, dan oval teratur (Soerodjo, 1989).



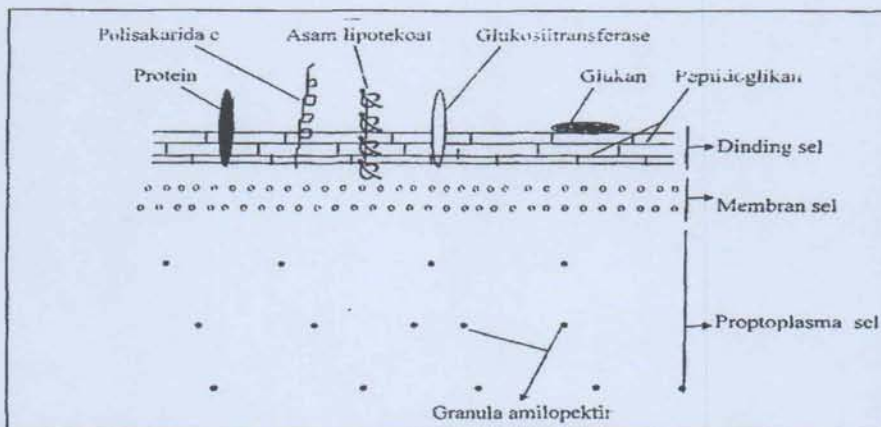
Gambar 2.1 : *S. mutans* (Capuccino, 1998)

Menurut Bachtiar (1997), *S. mutans* merupakan bakteri anaerobik fakultatif, non-hemofilik asidogenik, dan dapat memproduksi polisakarida ekstraseluler dan intraseluler. *S. mutans* tidak termasuk bakteri yang didapat sejak lahir, melainkan bakteri yang didapat sesuai perkembangan usia. Seperti pada



*coccus* gram positif lainnya, *S. mutans* terdiri dari dinding sel dan membran protoplasma. Matriks dinding sel terdiri atas peptidoglikan rantai silang yang mempunyai komposisi gula amino N-asetil, asam N-asetilnuramik dan beberapa peptida. Sedangkan struktur antigenik dinding sel *S. mutans* terdiri dari antigen protein, polisakarida spesifik dan asam lipotekoat. Antigen – antigen tersebut menentukan imunogenitas *S. mutans* (Lehner, 1995).

Sejumlah antigen yang telah ditemukan yang terpenting adalah protein, yang terdiri dari enzim glukosiltransferase dan antigen protein. Enzim glukosiltransferase berfungsi sebagai enzim yang mengubah sukrosa menjadi glukosa (Guo et al, 2004; Russel et al, 1999). Sedangkan antigen protein yang bersifat hidrofobik berfungsi pada proses interaksi *S. mutans* dan pelikel-pelikel di permukaan gigi (Guo et al, 2004).



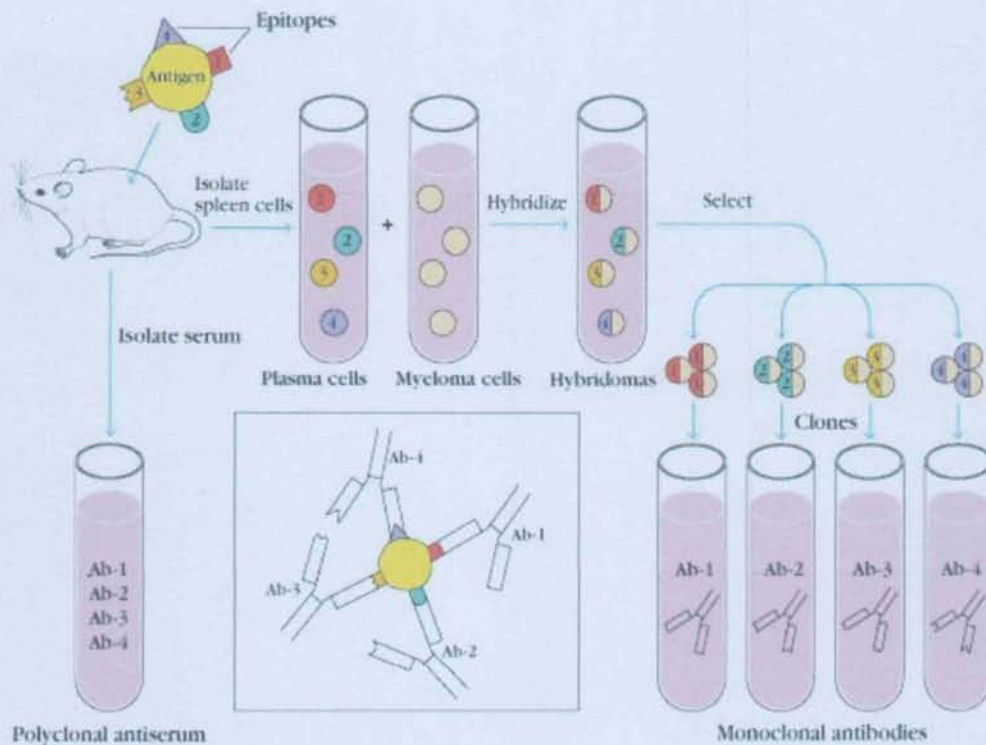
Gambar 2.2 : Struktur dinding sel *S. mutans* (Guo et al, 2004)

## 2.2 Antibodi Monoklonal

Antibodi monoklonal terjadi sebagai interaksi satu tipe epitop dengan satu klon limfosit B tunggal (Bangun, 1992). Menurut Artama (1992), antibodi monoklonal merupakan antibodi yang diproduksi dari satu klon sel yang hanya



menghasilkan satu kelas imunoglobulin. Antibodi monoklonal ini mempunyai spesifisitas tertentu (mempunyai kemampuan untuk mengenal hanya satu epitop), dengan afinitas yang tetap, serta mempunyai kelas atau kelas imunoglobulin tertentu.



Gambar 2.3 : Pembuatan antibodi monoklonal (Mayer, 2009)

### 2.2.1 Antibodi Monoklonal *S. mutans* 1(c) 67 kDa

Antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa merupakan antibodi monoklonal terhadap *S. mutans* 1 (c) 67 kDa yang telah dilakukan pemurnian di Pusvetma Surabaya. Menurut Devijanti (2006), sifat fisika antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa adalah sebagai berikut :

1. pH = 7.5
2. Produksinya dilakukan dengan pemberian *polyethylene glycol* (PEG) 40% - 50%.

3. Penyimpanan dilakukan dengan sodium trimersol dan sodium asida 0,02% pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
4. Pemanasan dari antibodi monoklonal ini dapat dilakukan sampai pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$ .
5. Konsentrasi 1 mg/ml

### 2.3 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah cara menilai sitotoksitas suatu bahan dengan menghitung jumlah atau pertumbuhan sel setelah terpapar bahan yang akan diuji (Craig & Powers, 2002). Uji sitotoksitas ini dimaksudkan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel, juga merupakan bagian dari evaluasi bahan kedokteran gigi yang diperlukan untuk prosedur skrining standar (Devijanti, 2006). Menurut Freshney (2000), uji sitotoksitas dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Uji primer (pendahuluan), yaitu uji toksisitas dari bahan secara *in vitro* yang dikontakkan secara langsung pada kultur sel atau jaringan.
2. Uji sekunder, yaitu evaluasi kemampuan bahan untuk menimbulkan toksisitas sistemik. Uji ini dilakukan pada hewan coba.
3. Uji aplikasi klinis, merupakan evaluasi bahan sesuai dengan pemakaian klinis atau identifikasi semua efek bahan yang akan digunakan pada jaringan, bahan tersebut ditempatkan sesuai fungsinya pada hewan seperti pada manusia.

Metode yang sering digunakan untuk uji sitotoksitas adalah kultur sel secara *in vitro*. Jenis sel yang sering digunakan untuk uji sitotoksitas bahan dan obat-obatan kedokteran gigi adalah kultur *cell-lines* misalnya sel BHK-21 (*baby*



*hamster kidney*) yang berasal dari fibroblas ginjal hamster. Pertimbangan menggunakan sel ini dikarenakan berasal dari embrio sehingga mudah tumbuh dan mudah dilakukan sub kultur ulang (Freshney, 2000). Kultur *cell lines* mempunyai keuntungan, yaitu kecepatan pertumbuhan sel tinggi, integritas sel tetap terjaga dan sel mampu bermultiplikasi dalam suspensi (Fazwishni & Hadijono, 2000).

Akhir dari uji sitotoksisitas ini dapat memberikan informasi konsentrasi antibodi maksimal yang masih memungkinkan sel bertahan hidup serta perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik. Salah satu metode untuk menilai sitotoksisitas suatu bahan adalah dengan menggunakan *MTT assay* (Fazwishni & Hadijono, 2000).

#### 2.4 *MTT Assay*

Salah satu syarat bahan yang digunakan dalam kedokteran gigi seharusnya tidak toksik, tidak mengiritasi, dan mempunyai sifat biokompabilitas atau bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik. Salah satu metode untuk menilai sitotoksisitas suatu bahan adalah uji enzimatis dengan pereaksi MTT. (Meizarini, 1994).

*MTT* adalah molekul larut berwarna kuning, yang dapat digunakan untuk menilai aktifitas enzimatis seluler. Bila sel dapat mereduksi MTT, formazan yang dihasilkan berwarna biru, tidak larut dan mengendap pada sel. Jumlah formazan yang terbentuk, proporsional dengan aktifitas enzimatis. Uji ini menghitung aktifitas dehidrogenase selular, mengubah bahan kimia yang disebut MTT,



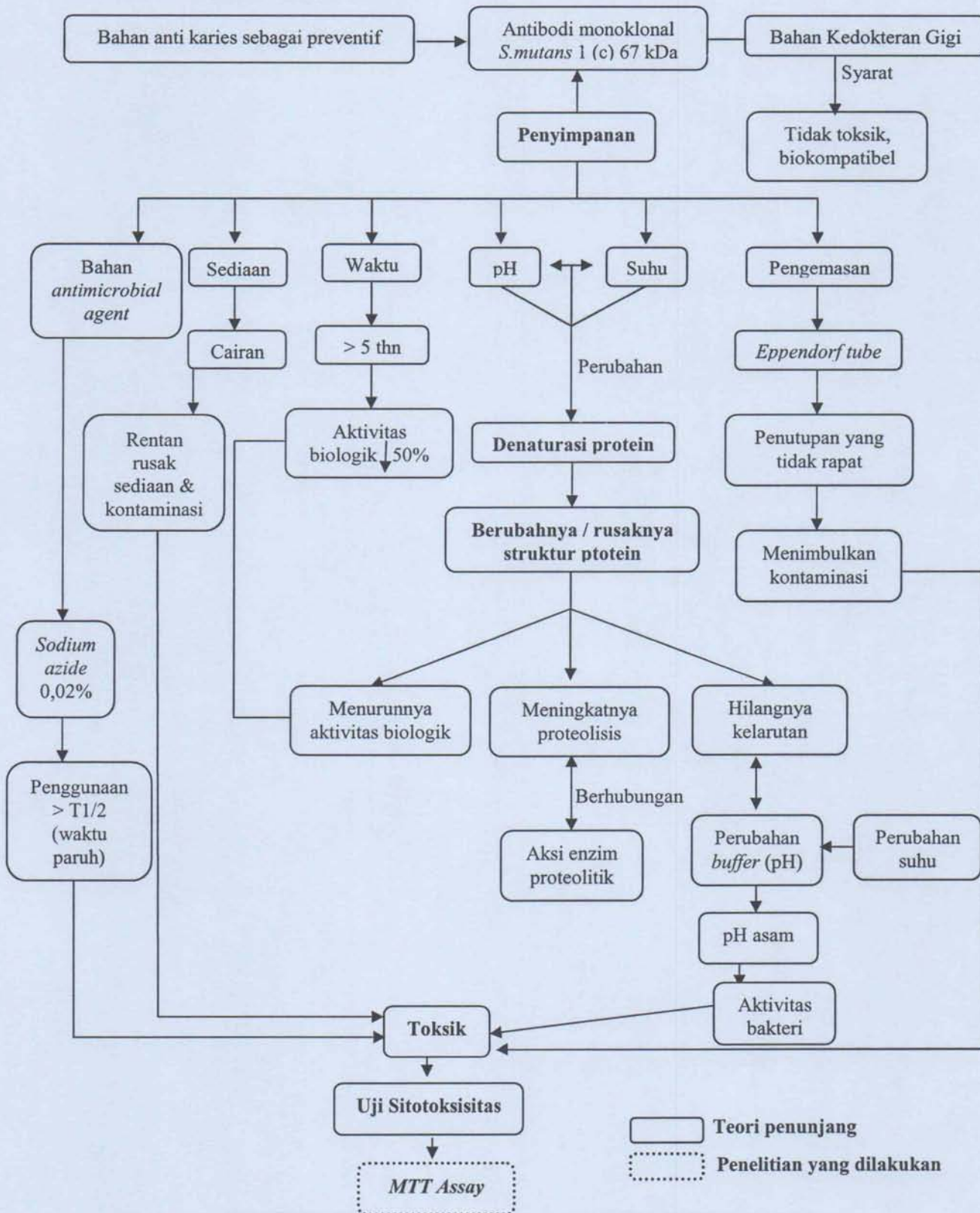
melalui sejumlah bahan reduksi selular menjadi senyawa biru, formazan yang tidak larut (Craig & Powers, 2002).

MTT Assay didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT. Prinsip Assay ini adalah pemecahan cincin tetrazolium MTT oleh adanya dehidrogenase pada mitokondria yang aktif, menghasilkan produk formazan biru keunguan yang tidak larut. Mekanismenya adalah garam tetrazolium berwarna kuning tersebut akan direduksi di dalam sel yang mempunyai aktifitas metabolik. Mitokondria dari sel hidup yang berperan penting dalam hal ini adalah yang menghasilkan dehidrogenase. Bila dehidrogenasi tidak aktif karena efek sitotoksik, maka formazan tidak akan dibentuk (Kasugai *et al*, 1991).

Produksi formazan dapat dihitung dengan melarutkannya dan mengukur densitas optik dari larutan yang dihasilkan (Craig & Powers, 2002). Reaksi warna biru keunguan digunakan sebagai ukuran dari jumlah sel hidup. Jumlah sel hidup dapat diukur sebagai hasil produk MTT dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540-570 nm (Fazwishni & Hadijono, 2000). Keuntungan *assay* ini adalah pengukuran lebih akurat dan sensitif karena menggunakan alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, manipulasi mudah, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, tenaga, dan tidak menggunakan isotop radioaktif (Dash, 2002).

MILIK  
 PERPUSTAKAAN  
 UNIVERSITAS AIRLANGGA  
 SURABAYA

3.1 Kerangka Konseptual





Antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa sebagai bahan kedokteran gigi harus memenuhi syarat bahan kedokteran gigi yaitu tidak toksik, tidak mengiritasi jaringan dan bersifat biokompatibel. Pada tahun 2001, Soerodjo dkk telah memproduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dalam jumlah banyak, dan untuk mempertahankan antibodi monoklonal tersebut diperlukan suatu penyimpanan. Namun, penyimpanan dapat menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi kestabilan antibodi monoklonal (Pacific, 2010). Faktor penyimpanan yang dapat mempengaruhi kestabilan antibodi adalah waktu, pH, suhu, pengemasan, dan sediaan. Faktor penyimpanan dapat menyebabkan denaturasi protein. Denaturasi protein menimbulkan rusaknya gugus rantai protein sehingga dapat mempengaruhi efektivitas antibodi monoklonal dan dapat mempengaruhi biokompatibilitas antibodi monoklonal (Ashton & Geary, 2001; Pierce B, 2010). Oleh karena itu, antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa yang telah dilakukan penyimpanan selama hampir 10 tahun ini perlu dilakukan uji sitotoksitas untuk mengetahui apakah antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa bersifat toksik atau tidak.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pasca penyimpanan suhu -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010) menimbulkan efek sitotoksik terhadap sel fibroblas (BHK-21).



#### **4.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dipergunakan adalah observasional analitik.

#### **4.2 Sampel Penelitian**

Berdasarkan penghitungan *sample size* pada lampiran 5, penelitian ini membutuhkan sampel minimal 7 berupa kultur sel fibroblas BHK 21. Sedangkan pada penelitian yang telah dilakukan, sampel yang digunakan adalah 8. Jadi, dapat disimpulkan bahwa hasil penelitian ini valid dan dapat diterima.

#### **4.3 Identifikasi Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas penelitian ini adalah antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pasca penyimpanan -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010).

##### **4.3.2 Variabel Tergantung**

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas yang hidup setelah pengujian.

##### **4.3.3 Variabel Terkendali**

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah media, alat, bahan dan cara kerja.

## 4.4 Definisi Operasional Penelitian

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

### 4.4.1 Antibodi Monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa

Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa adalah antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa yang telah diproduksi dalam bentuk sediaan cair pada *eppendorf tube* oleh Pusvetma Surabaya dan telah ditentukan antibodi kelasnya yaitu IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub>, antibodi tersebut spesifik terhadap protein 67 kDa dari dinding sel *S. mutans*.

### 4.4.2 Penyimpanan -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010)

Penyimpanan -20<sup>0</sup>C (periode 2001-2010) yang dimaksud adalah penyimpanan antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> pada *freezer* dalam suhu -20<sup>0</sup>C sejak tahun 2001 hingga 2010 di Pusat Veterinaria Farma, Surabaya.

### 4.4.3 Uji Sitotoksisitas

Uji sitotoksisitas yang dimaksud adalah uji yang bertujuan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel dengan menggunakan persentase sel yang hidup pada kultur sel dan dihitung berdasarkan rumus (Titien, 2002).

## 4.5 Alat dan Bahan

### 4.5.1 Alat – alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan alat-alat sebagai berikut :

- a. Mikroskop cahaya
- b. *Multichannel* pipet 50  $\mu$ l

c. Inkubator 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

d. *Microplate*

e. *Autoclave*

f. *Shaker*

g. Botol ukur *Roux*

h. *Sentrifuge*

i. *Elisa Reader*

j. *Laminar*

#### 4.5.2 Bahan-bahan yang digunakan

a. Sel fibroblas dari BHK 21 (*Baby Hamster Kidney*)

b. Media *Rosewell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)*

c. Pereaksi MTT

d. DMSO

e. Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub>.

#### 4.6 Tempat Penelitian

Pembuatan kultur jaringan dan penelitian *MTT assay* dilakukan di Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Antibodi Monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa

Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa dengan 3 kelas yaitu IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> yang telah dimurnikan di Pusat Veterinaria Farma



Surabaya dan telah disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dalam bentuk sediaan cair pada *ependorf tube* sejak tahun 2001 hingga 2010.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

#### 4.7.2 Persiapan Sel Fibroblas

Dalam penelitian ini sel fibroblas diambil dari kultur sel BHK-21 dalam bentuk *cell line* ditanam dalam botol *roux*. Setelah konfluen, kultur dipanen dengan menggunakan larutan *trypsin versene*. Hasil panen ditanam dalam media *Rosewell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)* yang mengandung 10% *fetal bovine serum albumin* diinkubasikan selama 24 jam suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , kemudian sel dipindahkan ke dalam botol kecil (*roux*) dan dibuat dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/ml. Sel dikultur ke dalam setiap sumur mikrolat 96-sumur sampai konfluen. Dengan demikian, setiap sumur berisi sel dan media RPMI dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/ml sebanyak 50  $\mu\text{l}$ .

#### 4.7.3 Pelaksanaan Eksperimen

1. Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa dimasukkan dalam lempeng sumuran (*well*) yang telah dipersiapkan sebelumnya dan berisi sel fibroblas dan RPMI sebanyak 50  $\mu\text{L}$ , kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Mempersiapkan kontrol sel sebagai kontrol positif yang juga berisi sel fibroblas dalam media kultur, dianggap persentase sel hidup 100%, dan media kultur negatif berisi media kultur saja, dianggap persentase 0 %.
3. Setiap sumuran ditambahkan pereaksi MTT 5mg/ml dalam PBS sebanyak 20  $\mu\text{L}$  untuk setiap sumuran dan diinkuasi selama 4 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .
4. Selanjutnya, setiap sumuran ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  DMSO. Lempeng sumuran diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

5. Melakukan pembacaan hasil pada setiap lempeng sumuran pada IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 620 nm.
6. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam optikal densitas atau absorben. Besar absorben setiap sumuran menunjukkan jumlah sel yang hidup dalam kultur media. Jumlah sel yang hidup adalah sel fibroblas *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) yang dapat menghasilkan konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer. Untuk mengetahui persentase jumlah sel hidup dihitung dengan menggunakan rumus (bisa dilihat pada lampiran 2). Apabila jumlah sel hidup kurang dari 60% maka dianggap toksik (Titien, 2002).

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{(OD \text{ perlakuan} + OD \text{ media})}{(OD \text{ kontrol sel} + OD \text{ media})} \times 100\%$$

Keterangan :

% sel hidup : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian.

OD Perlakuan : nilai *optical density* fibroblas pada setiap sampel.

OD media : nilai *optical density* fibroblas pada kontrol media.

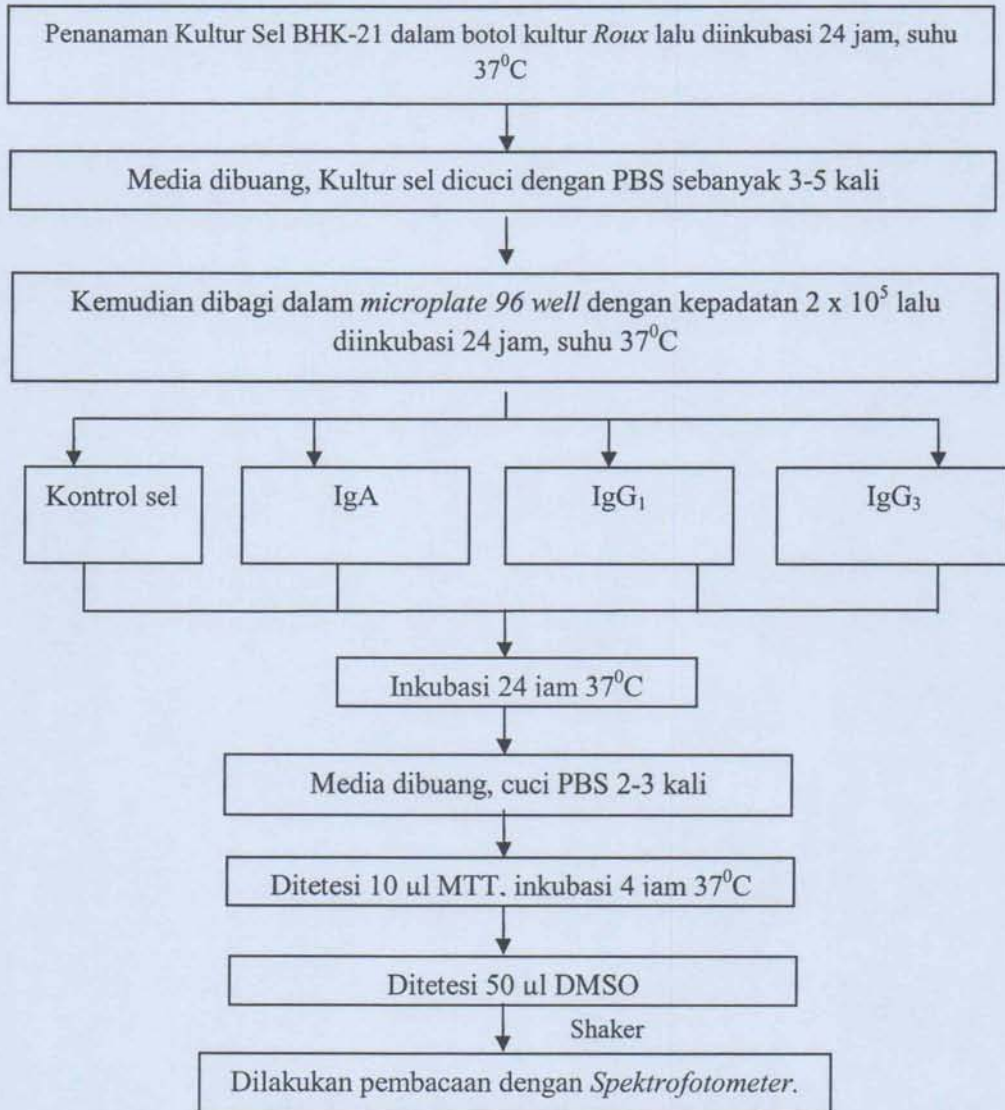
OD control sel : nilai *optical density* fibroblas pada kontrol sel.

## 4.8 Alur Penelitian

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Alur penelitian yang telah diuraikan di atas dapat digambarkan

pada bagan berikut :



## 4.9 Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis dengan uji statistik menggunakan *one way ANNOVA* dengan taraf kemaknaan 5% dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.



**BAB 5**  
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
**HASIL DAN ANALISIS DATA**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap sel fibroblas setelah pemberian antibodi monoklonal *S.mutans* 1 (c) 67 kDa dengan 3 sub kelas yang berbeda yaitu IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub>, terdapat hasil pembacaan dengan menggunakan *ELISA Reader* yang berupa tingkat absorbansi atau *optical density*, dengan angka-angka *optical density*. Hasil rerata, standar deviasi dan persentase sel hidup uji sitotoksitas antibodi monoklonal *S.mutans* 1 (c) 67 kDa dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 : Hasil rerata, standar deviasi dan persentase sel hidup uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa terhadap sel fibroblas BHK-21

Kelompok Perlakuan	N	$\bar{x}$	SD	% sel hidup	Keterangan
IgA	8	0.09350	0.009366	53%	Toksik
IgG <sub>1</sub>	8	0.28488	0.019504	99,99%	Tidak toksik
IgG <sub>3</sub>	8	0.24812	0.066068	99,69%	Tidak toksik
Kontrol sel	8	0.24912	0.020350	100%	
Kontrol media	8	0.08300	0.006547	0%	

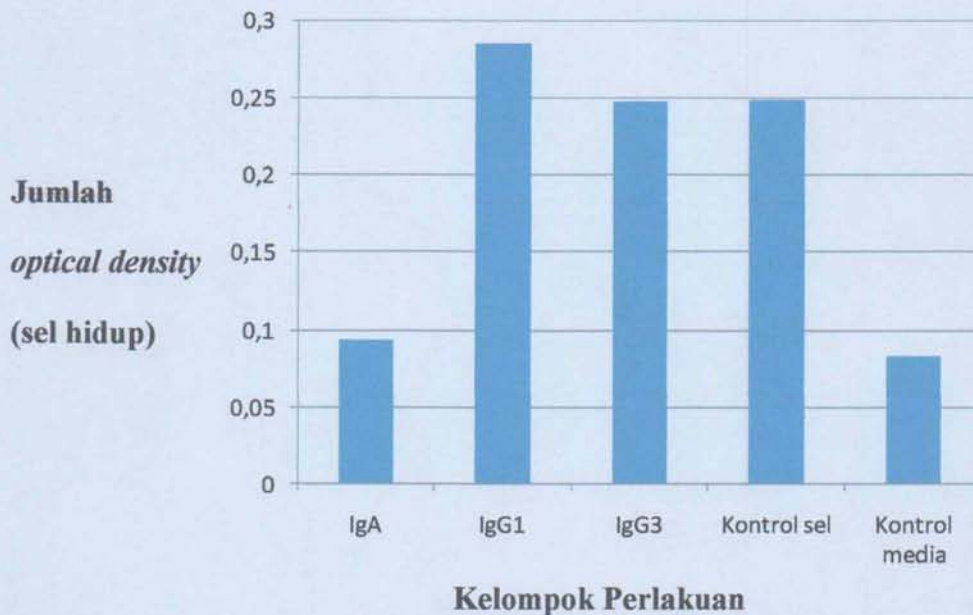
Keterangan :

- N = jumlah sampel
- $\bar{x}$  = rerata jumlah sel hidup
- SD = standar deviasi

Pada tabel 5.1 terlihat bahwa antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa dengan kelas yang berbeda mempunyai rerata densitas optikal yang berbeda. IgA mempunyai rerata densitas optikal paling rendah dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> yaitu sebesar 0,09350. Hasil ini menunjukkan bahwa

antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA mempunyai jumlah sel hidup paling rendah dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>, karena semakin rendah nilai densitas optikalnya maka semakin sedikit pula jumlah sel hidup yang terlihat sehingga dapat menunjukkan sifat toksisitas, dapat dilihat pada gambar 5.1.

Jika jumlah sel hidup kurang dari 60% maka menunjukkan sifat toksik (Titien, 2002). Jumlah sel hidup pada IgA mencapai 53% sehingga menunjukkan bahwa antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA mempunyai sifat toksik dibandingkan dengan kelas IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>.



Gambar 5.1 : Grafik rerata sel hidup uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21

Sebelum dilakukan uji analisis antar kelompok penelitian, dilakukan uji normalitas pada masing-masing kelompok dengan menggunakan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*, hasilnya menunjukkan bahwa seluruh kelompok

penelitian mempunyai nilai lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) yang berarti data pada seluruh kelompok penelitian berdistribusi normal.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Berdasarkan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test* menunjukkan bahwa data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, maka untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dari uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa dengan kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21 dilakukan perhitungan statistik dengan menggunakan *Oneway Anova* dengan  $\alpha = 0.05$ .

Hasil uji *Oneway Anova* diperoleh hasil data bahwa  $p = 0.000$  sehingga terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan karena  $p < 0.05$ . Hasil analisis ini menunjukkan bahwa uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21 terdapat perbedaan bermakna. Untuk mengetahui perbedaan bermakna tiap kelompok perlakuan maka dilakukan uji lanjutan *Oneway Anova* berupa *Tukey HSD* yang dapat dilihat pada tabel 5.2.



Tabel 5.2 : Hasil uji HSD sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK 21 (n=0,05)

Kelompok	IgA	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>3</sub>	Kontrol sel	Kontrol media	Signifikansi <i>One-way</i> <i>ANOVA</i>
IgA	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.966	p = 0.000*
IgG <sub>1</sub>	0.000*	-	0.182	0.204	0.000*	
IgG <sub>3</sub>	0.000*	0.182	-	1.000	0.000*	
Kontrol sel	0.000*	0.204	1.000	-	0.000*	
Kontrol media	0.966	0.000*	0.000*	0.000*	-	

\* : Bermakna

Pada tabel 5.2 dapat diketahui bahwa ada perbedaan bermakna dari uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA dengan IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, dan kelompok kontrol sel, tetapi pada IgA tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol media.

Pada kelompok IgG<sub>1</sub>, didapatkan perbedaan bermakna dari uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgG<sub>1</sub> dengan IgA dan kelompok kontrol media, tetapi pada IgG<sub>1</sub> tidak terdapat perbedaan bermakna dengan IgG<sub>3</sub> dan kelompok kontrol sel.

Pada kelompok IgG<sub>3</sub>, didapatkan perbedaan bermakna dari uji sitotoksitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgG<sub>3</sub> terhadap IgA dan kelompok kontrol media. Akan tetapi, pada IgG<sub>3</sub> tidak terdapat perbedaan bermakna dengan IgG<sub>1</sub> dan kontrol sel.

**BAB 6**  
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
**PEMBAHASAN**

Pada penelitian uji sitotoksitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> diperoleh hasil bahwa pada IgA mempunyai nilai densitas optikal yang lebih rendah dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub>. Setelah dilakukan penghitungan jumlah sel yang hidup dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa pada IgA jumlah sel yang hidup sebesar 53%, hal tersebut menunjukkan bahwa IgA mempunyai sifat toksik jika dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> yang mempunyai jumlah sel hidup sebesar 99,99% dan 99,69%.

Selain itu, pada penelitian uji sitotoksitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> diperoleh hasil bahwa IgA juga mempunyai nilai rerata densitas optikal lebih rendah yaitu sebesar 0,09350 dibandingkan dengan kontrol sel sebesar 0,24912, sehingga diantara dua kelompok tersebut didapatkan perbedaan yang bermakna.

Menurut Devijanti (2006), pada penelitian sebelumnya mengenai uji sitotoksitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> didapatkan data hasil yang menyatakan bahwa pada tahun ketika dilakukan uji sitotoksitas tersebut ketiga kelas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa tidak bersifat toksik. Pada IgA mempunyai nilai densitas optikal paling tinggi dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>. Hal ini menunjukkan bahwa IgA mempunyai persentase kematian sel paling rendah dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>.



Kedua hasil penelitian tersebut sangat berbeda. Yang membedakan dari kedua penelitian tersebut adalah adanya sifat toksik pada kelas IgA, padahal menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Devijanti (2006), IgA tidak mempunyai sifat toksik. Perbedaan yang sangat signifikan tersebut dipengaruhi oleh suatu hal atau faktor yang berkaitan dengan kondisi antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa itu sendiri. Perubahan sifat pada antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dipengaruhi oleh faktor penyimpanan. Faktor penyimpanan yang dapat mempengaruhi perubahan sifat suatu antibodi meliputi beberapa faktor antara lain suhu penyimpanan yang berfluktuasi, adanya kontaminasi, pendinginan yang berulang (Zuchner, 2010). Selain itu juga bisa ditinjau dari bentuk sediaan dan pengemasan.

Menurut Pacific (2010), suhu penyimpanan yang tepat untuk suatu antibodi dalam jangka waktu penyimpanan lebih dari 5 tahun dari awal pembuatan adalah  $-80^{\circ}\text{C}$ . Akan tetapi, fakta dilapangan menyebutkan bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Disamping itu pula, suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk antibodi monoklonal tersebut ternyata memiliki fluktuasi. Suhu penyimpanan yang kurang sesuai, serta adanya fluktuasi suhu penyimpanan dapat memicu rusaknya protein antibodi yang biasa disebut denaturasi protein (Zuhcner, 2010). Pada dasarnya, antibodi monoklonal merupakan suatu protein sehingga kurang stabil terhadap perubahan suhu maupun suhu penyimpanan yang kurang sesuai dan/atau mengalami fluktuasi.

Denaturasi protein merupakan suatu perubahan modifikasi rantai yang disertai dengan putusya ikatan peptida (Guire, 1999). Denaturasi mengakibatkan



rusaknya struktur protein yang menimbulkan berkurangnya energi kinetik terhadap kapasitas pengikatan (*binding capacity*), meningkatnya proteolisis, dan hilangnya kelarutan. Salah satu faktor utama yang memicu terjadinya denaturasi protein adalah perubahan suhu. Menurut Ashton & Geary (2001), menjelaskan bahwa perubahan suhu akan menimbulkan perubahan pH. pH merupakan pengukuran suatu ion hidrogen, apabila terjadi peningkatan suhu, maka jumlah ion hidrogen akan meningkat sehingga suasana menjadi asam, terbukti pula pada pemeriksaan pH ternyata menunjukkan bahwa pH antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA adalah 3. pH mempunyai peran dalam menentukan kemampuan bakteri untuk tumbuh dan berkembang pada lingkungan tertentu. Demikian halnya pada pH asam, juga dapat memicu tumbuhnya bakteri tertentu pada kelompok *acidophiles*. *Acidophiles* merupakan kelompok bakteri yang dapat hidup pada kondisi asam (Bacteria-Science Encyclopedia, 2011). Dengan adanya keterlibatan bakteri pada antibodi monoklonal tersebut maka diyakini dapat menimbulkan kontaminasi sehingga berakibat pada toksisitas antibodi.

Ditinjau dari aspek bentuk sediaan, sediaan yang digunakan pada antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa adalah dalam bentuk cairan. Menurut Glass & Haywood (2006), sediaan dalam bentuk cairan (*liquid*) merupakan sediaan yang kurang stabil, sehingga menimbulkan ketidakstabilan bahan utama. Ketidakstabilan dalam formulasi sediaan berkaitan dengan interaksi antara bahan utama dan bahan tambahan. Terkait dengan formulasi tambahan, pada sediaan antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa tersebut ditambahkan pula sodium azide 0.02% sebagai *antimicrobial agent*. Penggunaan *sodium azide* akan efektif jika digunakan sampai rentang waktu satu tahun (Antibodies, 2010). Dari

penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa ketidakstabilan antibodi monoklonal tidak hanya dipengaruhi oleh komposisi bahan utama melainkan juga formulasi tambahan.

Ditinjau dari aspek pengemasan, antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dikemas dalam *eppendorf tube*. Menurut Weil *et al* (1999), *eppendorf tube* merupakan kemasan yang stabil untuk penyimpanan protein yang dalam hal ini adalah antibodi monoklonal. Akan tetapi, jika terdapat beberapa kesalahan dalam pengemasan misalnya penutupan *eppendorf* yang tidak rapat, akan dapat menimbulkan kontaminasi. Adanya kontaminasi dengan faktor luar maka hal tersebut bisa menjadi pemicu terjadinya toksisitas suatu bahan yang disimpan. Oleh karena itu, penyimpanan antibodi harus terjaga dengan steril.

Ketiga kelas antibodi monoklonal tersebut disimpan dalam kondisi yang sama. Akan tetapi efek penyimpanan terhadap sitotoksitas antibodi monoklonal hanya terjadi pada kelas IgA. Hal ini disebabkan IgA dan IgG mempunyai sifat dan aktivitas biologiknya yang berbeda (Baratawidjaja, 2000). Dari penelitian ini diperoleh informasi baru bahwa antibodi monoklonal kelas IgA memiliki sifat peka terhadap kondisi lingkungan, dalam hal ini suhu penyimpanan, sehingga IgA memberikan respon berupa perubahan sifat sitotoksitas. Berbeda dengan IgG yang cenderung stabil dalam suhu penyimpanan yang tidak sesuai.

Dari penjelasan diatas, penulis memberikan rekomendasi terhadap penyimpanan antibodi berdasarkan tinjauan literatur. Antibodi monoklonal dalam penyimpanannya harus memperhatikan suhu penyimpanan, cahaya, dan menghindari kontaminasi (Antibody Storage Recommendations, 2010; Pierce A, 2010; Zuchner, 2010). Antibodi monoklonal yang akan disimpan selama kurang



lebih 1 tahun, maka sebaiknya disimpan dalam suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ . Sedangkan untuk penyimpanan selama 1-5 tahun, sebaiknya antibodi disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Untuk penyimpanan lebih dari 5 tahun, sebaiknya disimpan dalam suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  (Pacific, 2010). Selain itu perlu ditambahkan sodium azide 0.02% sebagai *antimicrobial agent*, jika antibodi ingin disimpan dalam kurun waktu yang singkat. Jika menginginkan penyimpanan lebih lama, sebaiknya menggunakan thimerosol 0.01% (Zuchner, 2010). Penyimpanan antibodi harus dengan suhu yang stabil dalam artian tidak berfluktuasi, juga tidak diperbolehkan dilakukan pendinginan berulang. Selain itu, dalam penyimpanan yang lama juga perlu penambahan *glycerol* sebagai *anti-freeze*. Antibodi monoklonal harus disimpan dalam kondisi steril dan kedap cahaya (Pacific, 2010). Jika protokol tersebut diperhatikan, kemungkinan antibodi monoklonal akan tetap stabil dan tidak bersifat toksik.



**7.1 Simpulan**

Dari penelitian ini dapat diambil suatu kesimpulan bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa pasca penyimpanan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (periode 2001-2010) menimbulkan efek sitotoksik terhadap sel fibroblas (BHK-21). Antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgA mempunyai sifat toksik dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>.

**7.2 Saran**

- a. Untuk menjaga kestabilan antibodi monoklonal, perlu diperhatikan tata cara penyimpanan antibodi yang baik dan benar serta hal-hal yang dapat mempengaruhi perubahan sifat antibodi monoklonal baik fisik dan biologis.
- b. Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa kelas IgG subkelas IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> sebagai antikaries bisa dijadikan sebagai bahan tambahan dalam produk kesehatan gigi dan mulut seperti *fissure sealant* dan *tooth mousse* untuk mencegah terjadinya karies gigi.

## DAFTAR PUSTAKA

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- Antibodies, 2010, Available from : [www.agrisera.com](http://www.agrisera.com), Accessed on Desember 25<sup>th</sup>, 2010.
- Antibody Storage Recommendations, 2010, Aves Labs, Inc. Available from [www.aveslab.com](http://www.aveslab.com), Accessed on Desember 12<sup>th</sup>, 2010.
- Artama WT, 1992, *Antibodi monoklonal teori, produksi, karakteristik dan penerapannya*. Pedoman Kuliah Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, hal.160-89.
- Ashton & Geary, 2001, *The Effects of Temperature on pH Measurement*. Reagecon Diagnostics Ltd, Shannon Free Zone, County Clare, Ireland. Available from : [www.reagecon.com](http://www.reagecon.com), Accessed on December 10<sup>th</sup>, 2010.
- Bachtiar, EW, 1997. *Prospek vaksinasi dalam pencegahan karies dengan antigen hasil rekayasa protein dinding sel Streptococcus mutans*, JKG UI: 4:641-7.
- Bangun, A, 1992, *Petunjuk laboratorium Antibodi Monoklonal*, PAU Bioteknologi Universitas Gajah Mada, hal. 10-14, 107-123.
- Baratawidjaja, KG, 2000, *Imunologi Dasar*. Ed IV, Cetakan I, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal.23.
- Capuccino, James G., & Natalie Sherman, 2001, *Microbiology : A Laboratory Manual*, 6<sup>th</sup> ed, Benjamin Cummings, San Fransisco.
- Craig RG & Powers SM, 2002, *Restorative dental materials*, 6<sup>th</sup> ed, London, Mosby Co., p.135-140.
- Dash P, 2002, *Standard protocols MTT assay*, Available from : [http://webb.bham.ac.uk/can\\_4\\_psd4/brum/mtt.html](http://webb.bham.ac.uk/can_4_psd4/brum/mtt.html), accessed on May 25<sup>th</sup>, 2010.
- Devijanti R, 2003, *Antibodi monoklonal Streptococcus mutans 1 (c) 67 kDa dalam pasta gigi untuk menghambat pertumbuhan Streptococcus mutans* Tesis.
- Devijanti R, dkk, 2006. *Uji tosisitas antibodi monoklonal Streptococcus mutans 1 (c) 67 kDa pada kultur dengan MTT assay*, LPPM UNAIR.
- Fazwishni S & Hadijono, 2000, *Uji sitotoksisitas dengan esei MTT*, JKG UI, 7:28-32.



Freshney, RI, 2000, *Culture of Animal Cell; a manual of Basic Technique 4<sup>th</sup> Edition*, New York: Wiley Liss Inc, p. 329-43.

IR.PERPUSTAKAAN.UNIVERSITAS.AIRLANGGA

Glass BD & Haywood A, 2006. *Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available product*, J Pharm Pharmaceut Sci 9(3):398-426. Available from : [www.cspscanada.org](http://www.cspscanada.org). Accessed on Desember 28<sup>th</sup>, 2010.

Guo JH, Jia R, Fan MW, & Bian Z, 2004, *Construction and immnuogenic characterization of a fusion anti caries DNA vaccine against PAC and glucosyltransferse I of treptococcus mutans*. J Dent Res; 83:266-70.

Kasugai S, Hasegawa N & Ogura A, 1991, *Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effect of phenolic compound on established rat pulp cell*. J Dent Rest, 70:127-130.

Lehner T, 1995, *Immunology pada penyakit mulut*, Alih bahasa : Farida R, Suryadhana NG, Ed 3, Jakarta : EGC, hal: 26-41,61-91.

Lemeshow S; Hosmer D; & Klar J, 1990, *Adequacy of sample size in health studies*, New York: John Wiley and Sons Ltd.

Mayer G, 2009, *Immunoglobulis – Structure and Function*, Microbiology and Immunology On-line. University of South Carolina School of Medicine.

Meizarini, A, 1994, *Sitotoksitas Bahan estorasi Cyanoacrylate pada Variasi Perbandingan Powder dan Liquid Menggunakan MTT Assay*. MKG UNAIR. hal:20-21

Murti B, 1997, *Prinsip dan Metode Riset Epidemiologi*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta, hal: 84-85.

Pacific, 2010, *Antibody storage*, Pacific Immunology, California. Available from <http://www.pacificimmunology.com>. Accessed on November 19<sup>th</sup>, 2010 at 19.47 WIB.

Panjaitan M, 1995, *Etiologi karies gigi dan penyakit periodontal*, Medan : USU Press, hal.14-21.

Pierce Antibodies. 2010. *Antibodies protocols*. Available from : Thermo Scientific Pierce Biotechnology, <http://www.piercenet.com>. Accessed on November 25<sup>th</sup>, 2010 at 14.45 WIB.



- Pierce Biotechnology, 2010, *Protein stability and storage*. Available from : Thermo Scientific Pierce Biotechnology, <http://www.piercenet.com>. Accessed on November 18<sup>th</sup>, 2010 at 19.28 WIB.
- Roeslan BO, 2009, *Hambatan Terjadinya Karies Gigi Setelah Diimunisasi Dengan Glukosiltransferase Streptococcus mutans INA99 yang Diaplikasikan pada Mukosa Rongga Mulut : Kajian pada Tikus jenis Wistar*. Dental Caries Research. Tersedia pada : <http://jurnal.dikti.go.id> Diakses pada tanggal 1 Mei 2010 jam 15.30.
- Roitt, Ivan, 2002, *Imunologi*, Edisi 8, Alih bahasa : Alida Harahap, Jakarta : Widya Medika.
- Bacteria – Characteristic of bacteria, bacterial growth, physycal and chemical requirements for bacterial growth*, 2011, Science Encyclopedia. Available from : <http://science.jrank.org/pages/714/Bacteria.html>. Accessed on January 5<sup>th</sup>, 2011.
- Slot J, Taubman MA, 1992, *Contemporary oral microbiology and immunology*, Mosby Year Book, p.366-69, 377-414.
- Soerodjo, TS, 1989, *Respon Imun Humoral terhadap Streptococcus mutans Sehubungan dengan Karies gigi*, Disertasi UNAIR Surabaya, hal.12-88.
- Sundoro, Edi Hartini, 2001, *Konsep Baru Perawatan Karies*, FKG UI, Tersedia pada <http://www.pdpersi.co.id>, Diakses pada 20 Mei 2010.
- Terry, 2003, *Microbial Growth and Its Control*, Available from : [www.mcb229.com](http://www.mcb229.com), Accessed on December 21<sup>th</sup>, 2010.
- Titien HA, 2002, *Pengaruh tegangan listrik dan lama penyinaran semen ionomer gelas modifikasi resin terhadap kekerasan permukaan dan sitotoksisitas*. Thesis Pascasarjana UNAIR, Surabaya.
- Van Noort, 2006, *Introduction to dental material, 2nd edition*, London, CV. Mosby Company, p.3-5.
- Weil N *et al*, 2010, *Eppendorf Safe-Lock Tube*, Available from : [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com), Accessed on Desember 28<sup>th</sup>, 2010 at 20.10.
- Yuliati, A, 2005, *Uji Biokompatibilitas Resin Akrilik Jenis Otopolimerisasi pada Sel Fibroblas*, MKG UNAIR:63, hal.128.

Zatnika I, 2009, *Penyakit Gigi dan Mulut*, Tersedia pada : [www.depkes.go.id](http://www.depkes.go.id).

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Diakses pada tanggal 24 September 2010 jam 15.50 WIB.

Zuchner, 2010, *Protein Structure*, Available from : [www.reagecon.com](http://www.reagecon.com), Accessed on December 21<sup>th</sup>, 2010 at 14.14.

**Lampiran 1 *Optial density* (Absorbansi toksisitas)**

**Tabel hasil pengamatan *optical density* perlakuan dan kontrol**

No.	Antibodi			Kontrol	
	IgA	IgG1	IgG3	Sel	Media
1.	0.106	0.293	0.294	0.248	0.083
2.	0.082	0.327	0.33	0.239	0.084
3.	0.093	0.288	0.263	0.230	0.084
4.	0.107	0.271	0.252	0.238	0.093
5.	0.092	0.286	0.133	0.276	0.081
6.	0.086	0.267	0.306	0.248	0.075
7.	0.085	0.269	0.225	0.284	0.074
8.	0.097	0.278	0.182	0.230	0.090
Rata-rata	0.09350	0.28488	0.24812	0.24912	0.08300



## Lampiran 2. Perhitungan % sel hidup

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Rumus penghitungan % sel hidup (Titien, 2002):

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{(OD \text{ perlakuan} + OD \text{ media})}{(OD \text{ kontrol sel} + OD \text{ media})} \times 100\%$$

Keterangan :

% sel hidup : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian.

OD Perlakuan : nilai *optical density* fibroblas pada setiap sampel setelah pengujian hasil pembacaan dengan *Elisa Reader*.

OD media : nilai *optical density* fibroblas pada kontrol media.

OD control sel : nilai *optical density* fibroblas pada kontrol sel.

**Jika % sel hidup > 60 % = tidak toksik (Titien, 2002).**

Persentase sel hidup tiap kelompok :

I. 
$$\% \text{ Sel Hidup IgA} = \frac{(\text{optical density perlakuan} + \text{optical density media})}{(\text{optical density kontrol sel} + \text{optical density media})} \times 100\%$$
$$= \frac{(0.09350 + 0.08300)}{(0.24912 + 0.08300)} \times 100\%$$
$$= \frac{0.17650}{0.33212} \times 100\%$$
$$= 53,11 \% = 53\%$$

II. 
$$\% \text{ Sel Hidup IgG1} = \frac{(\text{optical density perlakuan} + \text{optical density media})}{(\text{optical density kontrol sel} + \text{optical density media})} \times 100\%$$
$$= \frac{(0.28488 + 0.08300)}{(0.24912 + 0.08300)} \times 100\%$$
$$= \frac{0.36788}{0.33212} \times 100\%$$
$$= 110,77 \% \approx 99.99\%$$

III. 
$$\% \text{ Sel Hidup IgG3} = \frac{(\text{optical density perlakuan} + \text{optical density media})}{(\text{optical density kontrol sel} + \text{optical density media})} \times 100\%$$
$$= \frac{(0.24810 + 0.08300)}{(0.24912 + 0.08300)} \times 100\%$$

$$= \frac{0.33110}{0.33212} \times 100\%$$

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

$$= 99,69 \%$$



Lampiran 3. Uji Normalitas (*Kolmogorov-Smirnov test*)

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Immunoglobulin A	Immunoglobulin G1	Immunoglobulin G3	Kontrol sel	Kontrol media
N		8	8	8	8	8
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.09350	.28488	.24812	.24912	.08300
	Std. Deviation	.009366	.019504	.066068	.020350	.006547
Most Extreme Differences	Absolute	.163	.213	.148	.272	.189
	Positive	.163	.213	.108	.272	.189
	Negative	-.159	-.180	-.148	-.174	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.462	.604	.420	.769	.535
Asymp. Sig. (2-tailed)		.983	.859	.995	.595	.937

a. Test distribution is Normal.

**Lampiran 4. Uji satu arah Annova (*One Way Annova*)****Oneway****Descriptives**

Optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
IgA	8	.09350	.009366	.003311	.08567	.10133	.082	.107
IgG1	8	.28488	.019504	.006896	.26857	.30118	.267	.327
IgG3	8	.24812	.066068	.023359	.19289	.30336	.133	.330
Kontrol sel	8	.24912	.020350	.007195	.23211	.26614	.230	.284
Kontrol media	8	.08300	.006547	.002315	.07753	.08847	.074	.093
Total	40	.19172	.091987	.014544	.16231	.22114	.074	.330

**Test of Homogeneity of Variances**

Optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.121	4	35	.000

**ANOVA**

Optical density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.293	4	.073	69.227	.000
Within Groups	.037	35	.001		
Total	.330	39			



## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical density

	(I) Antibodi Monoklonal	(J) Antibodi Monoklonal	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	IgA	IgG1	-.191375*	.016264	.000	-.23813	-.14462
		IgG3	-.154625*	.016264	.000	-.20138	-.10787
		Kontrol sel	-.155625*	.016264	.000	-.20238	-.10887
		Kontrol media	.010500	.016264	.966	-.03626	.05726
IgG1	IgA	IgG1	.191375*	.016264	.000	.14462	.23813
		IgG3	.036750	.016264	.182	-.01001	.08351
		Kontrol sel	.035750	.016264	.204	-.01101	.08251
		Kontrol media	.201875*	.016264	.000	.15512	.24863
IgG3	IgA	IgG1	.154625*	.016264	.000	.10787	.20138
		IgG3	-.036750	.016264	.182	-.08351	.01001
		Kontrol sel	-.001000	.016264	1.000	-.04776	.04576
		Kontrol media	.165125*	.016264	.000	.11837	.21188

Kontrol sel	IgA	.155625*	.016264	.000	.10887	.20238
	IgG1	-.035750	.016264	.204	-.08251	.01101
	IgG3	.001000	.016264	1.000	-.04576	.04776
	Kontrol media	.166125*	.016264	.000	.11937	.21288
Kontrol media	IgA	-.010500	.016264	.966	-.05726	.03626
	IgG1	-.201875*	.016264	.000	-.24863	-.15512
	IgG3	-.165125*	.016264	.000	-.21188	-.11837
	Kontrol sel	-.166125*	.016264	.000	-.21288	-.11937

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Homogeneous Subsets****Optical density**

	Antibodi Monoklonal	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	Kontrol media	8	.08300	
	IgA	8	.09350	
	IgG3	8		.24812
	Kontrol sel	8		.24912
	IgG1	8		.28488
	Sig.		.966	.182

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.



**Lampiran 5. Perhitungan *Sample Size***Hypothesis tests for two population means (two-sided test)

Level of significance (%)	5
Power the test (%)	90
Population standard deviation	0.020350
Population variance	0.0004141225
Test value of the population mean	0.28488
Anticipated population mean	0.24812
<b>Sample size</b>	<b>7</b>

Perhitungan ManualRumus Lemeshow *et al* (1990) :

$$n = \frac{2\sigma^2 (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_0 - \mu_1)^2}$$

Keterangan :

n = besar sampel

 $\sigma$  = standar deviasi kontrol sel = 0.020350 $Z_{1-\alpha/2}$  = harga standar normal (tergantung harga  $\alpha$ ;  $\alpha = 0,05$ ) = 1,96 $Z_{1-\beta}$  = besarnya kekuatan penelitian ( $\beta = 0,10$ ) = 1,282 $\mu_0 - \mu_1$  = beda rata-rata masing-masing kelompok

Jadi, perhitungannya :

$$n = \frac{2\sigma^2 (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_0 - \mu_1)^2}$$

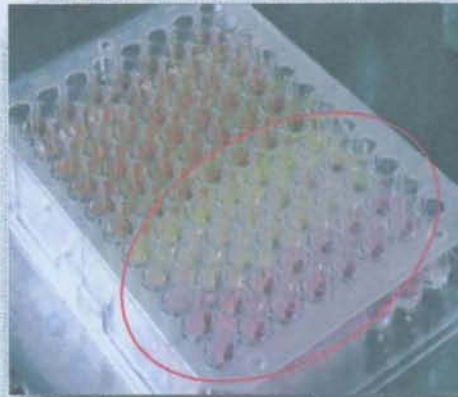
$$n = \frac{2 (0,020350)^2 (1,96 + 1,282)^2}{(0.28488 - 0.24812)^2}$$

$$n = 7$$

**Jadi, sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini sebesar 7.**

## Lampiran 6. Alat dan Bahan

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA



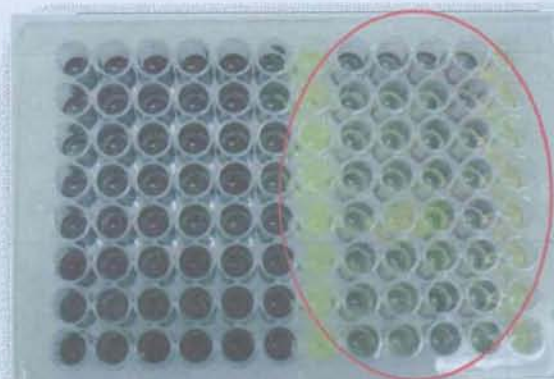
Gb.1. *Microplate* kelompok perlakuan dan kontrol (*plate* no. 7,8,9,10,dan 12).



Gb.2. Media RPMI, FBS, dan PBS



Gb.3. Pereaksi MTT

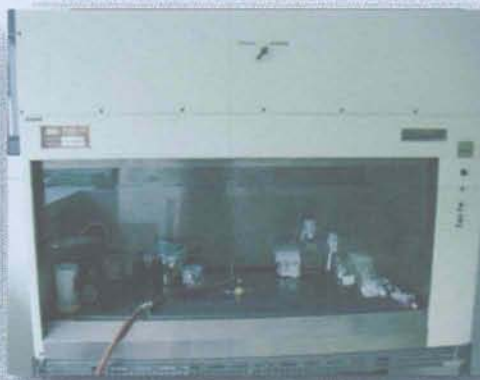


Gb.4. *Microplate* kelompok perlakuan dan kontrol (*plate* no. 7,8,9,10,dan 12) setelah direaksikan dengan MTT .





Gb.5. *Micropipet* dan tip 50µl



Gb.6. *Laminar* (Tempat kerja)



Gb.7. *Centrifuge*



Gb.8. *Shaker*



Gb.9. *Elisa Reader*



Gb.10. Mikroskop



Gb.11. Inkubator