

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan agustus sampai oktober 2018 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pemeliharaan tikus, terapi *Adipose Stem Cell* dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Proses isolasi *thawing*, kultur, *adipose stem cell* dilakukan di *Stem Cell Research and Development Centre* Universitas Airlangga Surabaya. Pemeriksaan immunohistokimia dilakukan di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

4.2 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan ialah *eksperimental laboratories*. Rancangan penelitian ini adalah *post test control design group* (Hanafiah, 2004).

4.3 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria inklusi tikus:

- Tikus *Rattus novergicus* jantan umur 3 bulan dan berat 200- 300 gram.
- Tikus sehat, ditandai gerakan aktif tidak cacat, mata tidak pucat, bulu tidak kusam.

4.4 Besar Sampel

Besar sampel penelitian, menggunakan rumus Lemeshow (Lemeshow, 1990):

$$n = \frac{2\sigma^2 (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n = \frac{2 (1,364)^2 (1,64+1,214)^2}{(3,909-1,856)^2}$$

$$n = 7,1909$$

Keterangan:

n = besar sampel

σ = standar deviasi kelompok perlakuan (Haryani, 2013)

$Z_{1-\alpha}$ = harga standar normal yakni 1,64 bila $\alpha = 0,05$

$Z_{1-\beta}$ = harga standar normal (tergantung harga β), yakni 1,214

μ_1 = rata-rata jumlah keratinosit kelompok kontrol (Haryani, 2013)

μ_2 = rata-rata jumlah keratinosit kelompok perlakuan (Haryani, 2013)

Jumlah sampel tiap kelompok adalah 7. Untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat tikus yang mati dan sakit selama penelitian, maka jumlah sampel tiap kelompok ditambah sebesar 10%. Jadi, jumlah sampel minimal tiap kelompok diperbanyak menjadi 8 sehingga jumlah seluruh sampel penelitian menjadi 16 ekor tikus.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

Pemberian *Adipose Stem Cell*

Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

Ekspresi integrin *Alpha 3 Beta 1*

Proliferasi Fibroblas

Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah :

Umur, berat badan, makanan, pemeliharaan tikus wistar, waktu pengambilan sampel dan prosedur penelitian

4.6 Definisi Operasional

1. Ekspresi integrin *Alpha 3 Beta 1* adalah jumlah integrin alpha 3 beta 1 yang diekspresikan di sel fibroblas dengan pemeriksaan imunohistokimia, dan pembesaran sebanyak 400 kali pada 3 lapangan pandang.
2. Penambahan *Adipose Stem Cel* merupakan penambahan stem sel yang diambil dari proses *thawing* jaringan lemak manusia daerah *visceral* yang telah dilakukan *cryopreservation*, dengan menginjeksikannya sebanyak 10^6 (0,1 ml) pada *sulcus* gingiva antara dua gigi insisif tikus *Rattus novergicus* yang dibuat luka dengan *curretage*.
3. *Curretage* pada *sulcus* gingiva antara dua gigi insisif tikus *Rattus novergicus* adalah pembuangan jaringan yg melekat diantara dasar poket dan *alveolar crest* dengan gerakan *scooping* dari dasar ke permukaan gigi.
4. Proliferasi fibroblas adalah jumlah fibroblas pada preparat *sulcus* gingiva antara duagigi insisif tikus *Rattus novergicus* dalam bentuk sel memanjang dengan cabang sitoplasma halus dan kromatin padat dan

dihitung dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada 3 lapangan pandang yang berbeda.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan, antara lain:

- Tikus (*Rattus novergicus*)

-*Adipose Stem Cell*

-Proliferasi Fibroblast

- Primary Anti-*Fibronectin*

- Alkohol 70%

- Formalin 10%

- Enzim *trypsin*

- Air suhu 37°C

-Antibodi CD 73

-Antibodi CD 90

- Antibodi CD105

- Antibodi CD 45

- Lidokain

- Medium *αMEM*

-*Tripan Blue*

-EDTA 140g

-Pengecatan HE

Peralatan yang digunakan meliputi:

-*Sonde*

-*Petridish*

- *Dissposable Sduit*
- Pinset
- Konikal *Cup* 5 ml
- Pipet
- *Baker Glass*
- *Obyek Glass*
- *Cover Glass*
- Mikroskop *Fluoresence*
- Peralatan Bedah
- Kandang Tikus
- Sentrifuse
- Hemositometer
- Tampon

4.8 Prosedur Penelitian

1. Pembuatan luka pada *sulcus* gingiva antara dua gigi insisif tikus dengan melakukan *curettage*. *Curettage* dilakukan dengan teknik scooping untuk melepaskan perlekatan gingiva ke gigi tikus wistar. *Curettage* dilakukan pengulangan sebanyak dua sampai tiga kali (Stahl, 1966).

2. Persiapan *Thawing*, Kultur, *Adipose Stem Cell*

Pemilihan *adipose stem cell* yang dilakukan *thawing*, yaitu *adipose stem cell* pada *passage* 2 sampai *passage* 5 dan telah dilakukan *cryopreservation*. *Thawing* dilakukan dengan mengambil *cryobag adipose stem cell* yang dibekukan pada suhu -80°C dan meletakkannya pada air dengan suhu 30°C selama 2-3 menit hingga mencair. Setelah cair,

masukkan ke konikal *cup* 5 ml dan ditambahkan medium hangat 37°C sebanyak 5 ml serta disentrifuse dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Setelah dilakukan sentrifuse, cairan pada bagian atas (*supernatan*) dibuang agar DMSO (*dimethylsulfoxide*) terbuang dan bagian bawah (*pellete*) serta medium 5 ml dilakukan resuspensi. Proses tersebut diulang 2 sampai 3 kali, kemudian dilakukan kultur pada medium α MEM selama 14 hari. Selanjutnya, sel yang telah dikultur dilakukan split, diperbanyak, dan dilakukan tripsinasi hingga mendapatkan monolayer. *Adipose stem cell* diambil sebanyak 10^6 yang penghitungannya melalui pengecatan *Trian Blue* dan dibaca dengan hemositometer (Minoncino, 2014).

3 Kelompok perlakuan

Penelitian ini terdiri dari 2 kelompok yaitu :

Kontrol: Kelompok tikus hewan coba dilukai dengan melakukan *curettage* pada *sulcus* gingiva antara dua gigi insisif kemudian diinjeksi PBS $10^6(0,1$ ml) (Stahl, 1966).

Perlakuan : Kelompok tikus dilukai dengan melakukan *curettage* pada *sulcus* gingiva antara dua gigi insisif kemudian diinjeksi *Adipose Mesenchymal Stem Cell* $10^6(0,1$ ml)(Stahl, 1966; Tsuji *et al*, 2014) .

Hewan coba pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditunggu selama 14 hari dan selanjutnya hewan coba dikorbankan dengan cara terminasi. Pembuatan preparat dengan cara pemotongan arah sagital pada daerah yang telah dilakukan *curretage* setelah didekalsifikasi menggunakan EDTA 140g. Proses dekalsifikasi ditunggu selama 30 hari (Stahl, 1966; Larjava, 2012; Prasad & Donoghue, 2013).

4. Metode Pemeriksaan Sampel

a. Pemeriksaan ekspresi *Alpha 3 beta 1* dengan metode Immunohistokimia dan proliferasi fibroblast dengan pengecatan HE

b. Metode pembacaan preparat Immunohistokimia

Metode pembacaan preparat immunohistokimia dengan menghitung ekspresi *Alpha 3 Beta 1* pada hari ke 14 (Larjava, 2012) dengan Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*), yaitu hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif.

Skor presentase sel imunoreaktif, meliputi:

skor 0: tidak ada sel positif

skor 1: sel positif kurang dari 10%

skor 2: sel positif antara 11-50%

skor 3: sel positif antar 50-80%

skor 4: sel positif lebih dari 80%

Intensitas warna dinilai dengan skor:

skor 0: tidak ada reaksi warna,

skor 1: intensitas warna rendah,

skor 2: intensitas warna sedang,

Skor 3: intensitas warna kuat. (Tavakoli et al, 2011; Novak, 2007)

c. Pemeriksaan proliferasi fibroblas dengan pengecatan HE

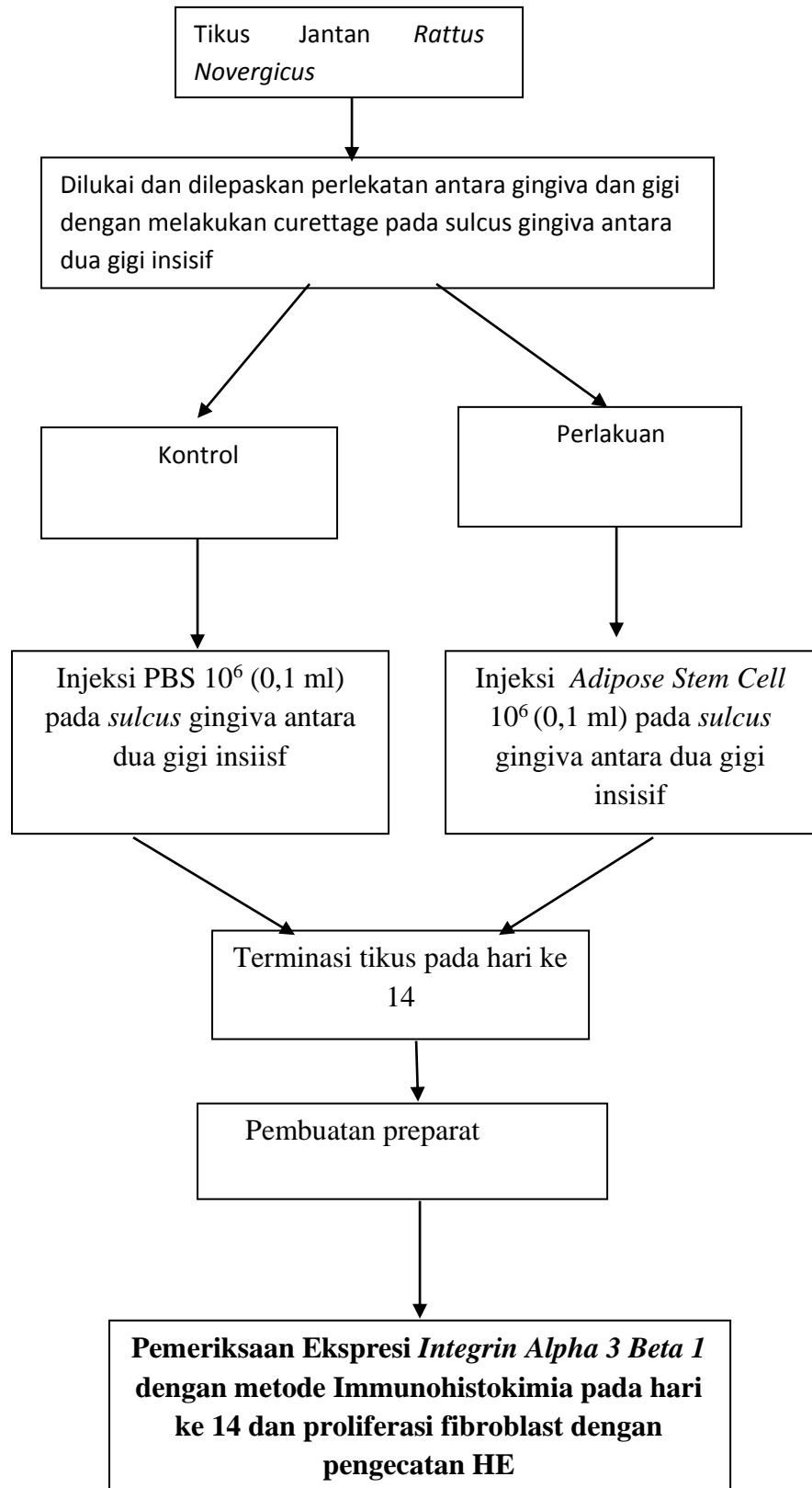
d. Metode penghitungan proliferasi fibroblas

Perhitungan proliferasi fibroblas mengacu pada Sachariva H (2011)

dalam Tjhoeng cahaya dengan pembesaran 10 kali untuk melihat daerah

curretage, selanjutnya diubah dengan pembesaran 400 kali dengan bantuan skala, kemudian amati proliferasi fibroblas pada daerah *curretage*. Perhitungan proliferasi fibroblas dengan melihat 3 lapangan pandang.

4.9 Alur Penelitian



4.10 Analisis data

Data yang diperoleh dari pengamatan ekspresi integrin *Alpha 3 Beta 1* dan merupakan data ordinal sehingga tergolong jenis data non parametrik. Analisis data non parametrik tidak perlu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas data. Analisa data non parametrik dengan uji *Mann-Whitney* Sedangkan hasil penghitungan proliferasi fibroblas dengan pengecatan HE merupakan data parametrik sehingga dilakukan uji *Normalitas Shapiro-Wilk*, *uji levene*, dan *uji one way annova* . (Tavakoli et al, 2011).

Dalam memudahkan perhitungan statistik digunakan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 20. Bila didapatkan harga kemaknaan (signifikansi atau dan mendekati signifikansi) yang lebih kecil dari harga $\alpha = 0,05$ maka hipotesis nol (H_0) diterima dan bila tidak didapatkan harga kemaknaan (signifikansi atau dan mendekati signifikansi) yang lebih besar dari harga $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak (Dingwall S, 2012; Xing *et al*, 2012).