

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorik

4.2 Sampel penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur sel-sel pulpa yang berasal dari gigi manusia yang utuh, bebas karies, dan baru diekstraksi (kurang dari enam jam). Gigi tersebut merupakan gigi dengan indikasi ekstraksi, misal untuk perawatan ortodonti yang diperoleh dari RSGMP dan bagian Bedah Mulut RSCM Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Sedangkan bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah xylitol konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16% produksi Lotte, Jepang

4.3 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan Juni 2008 sampai dengan Desember 2008

4.4 Variabel penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Xylitol dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%

4.4.2 Variabel Terikat

Viabilitas sel dan profil protein sel

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Xylitol adalah gula alkohol alami yang tersusun dari lima rantai karbon (*pentitol*). Dalam penelitian ini digunakan xylitol (Lotte, Jepang) dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%.

4.5.2 Sel-sel Pulpa Gigi adalah sel pulpa dari gigi sehat manusia yang baru diekstraksi kurang dari enam jam. Sel-sel pulpa yang dipakai adalah sel-sel pulpa hasil kultur primer.

4.5.3 Viabilitas Sel adalah suatu parameter yang digunakan untuk mengetahui reaksi suatu sel bila dipajankan zat asing. Viabilitas sel ditentukan dengan MTT *colorimetric bioassay* untuk mendeteksi secara kuantitatif sel hidup berdasarkan perubahan warna.

4.5.4 Profil Protein adalah gambaran *band-band* berbagai protein dalam sel pulpa yang merupakan hasil SDS PAGE dengan *double staining*. Berat molekul *band-band* protein sel pulpa diketahui dengan mengacu pada berat molekul *protein marker* yang dipakai, yaitu *See Blue Plus 2*.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

1. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
2. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
3. Alat-alat SDS-PAGE yang terdiri dari : *electrophoresis tank*, sisir, *Bio-rad glass plate*, *guidance*.
4. *Aluminium foil*
5. *Autoclave*
6. *Cell scrapper*
7. Cawan Petri (CORNING)
8. *Biohazard cabinet*
9. Botol *Schott*
10. Botol plastik kecil (bekas rol film)
11. BR-2000 Vortexer (Bio-Rad)
12. Electrophoresis Power Supply – EPS 601 (amersham pharmacia biotech)
13. Eppendorf *Tube*
14. Finnpiette (Labsystems)
15. Finnpiette (BIOHT-Proline)
16. Gelas ukur

17. GEL DOC 2000, Chemi Doc (Bio-Rad)
18. *Hemocytometer*
19. Inkubator (Memert)
20. Jarum ekstirpasi
21. Kertas hisap
22. *Magnetic stirrer*
23. *Microplate reader* (Bio-Rad)
24. Mikroskop (Nikon Eclipse 80i)
25. Mini Centrifuge (Bio-Rad)
26. *Masker & gloves*
27. *Mortar dan pestle*
28. *Orbital Shaker* (CERTOMAT, Biotech international)
29. pH Meter MP 220 (METTLER TOLEDO)
30. Pinset
31. Pisau skalpel
32. Pipet (Eppendorf, German)
33. *Pasteur Pipette*
34. 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 μm)
35. Sentrifugator (SORVALL)
36. *Syringe* 1 ml (Terumo)
37. *Syringe* 50 ml (Terumo)
38. Tabung Erlenmeyer
39. Thermo-block NB-305TB (N-BIOTEK, INC)
40. *Thermolyne, stir plate* (Nuova)
41. Timbangan elektronik
42. Tip
43. *Tube* 15 ml (Corning 430791, USA)
44. *Tube* 50 ml (Corning 430829, USA)
45. *Water bath* (CERTOMAT, Biotech International)
46. *White Light* 2000 (Bio-Rad)

4.6.2 Bahan Penelitian

1. 0,2 M Natriumhidroksida (MERCK, Darmstadt, German)
2. AgNO₃ 20% (MERCK, Darmstadt, German)
3. *Acetic Acid*
4. *Acrylamide*
5. *Ammonium Persulfate ACS Grade*
6. *Aquadest*
7. *Citric Acid*
8. *Coomassie blue*
9. *Ethanol 70%*
10. *Fetal Bovine Serum* (FBS)
11. *Formaldehyde 37%*
12. *Fungizone* (Amphotericin B 250 UG/ml) produksi Gibco UK
13. Gigi sehat tanpa karies yang baru diekstraksi
14. *Glycine* (Applichem, Darmstadt, German)
15. Bahan untuk MTT assay :
 - Larutan MTT 5 mg/ml (Sigma, USA)
 - *Acidified Isopropanol*
16. Larutan NaCl 0,9%
17. Medium Kultur: Bubuk *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) high glucose dan mengandung: *L-Glutamine*, 110mg/l *Sodium Pyruvate*, dan *Pyridoxine Hydrochloride* (Gibco, UK)
18. *Methanol*
19. *MilliQ water*
20. Na₄OH (*Concentrate*)
21. NaHCO₃ 7,5%
22. *Native Sample Buffer* (BioRad)
23. *Penicillin – Streptomycin* (Gibco, UK) yang mengandung :
 - 10.000 Units/ml *Penicillin G Sodium*
 - 10.000 µg/ml *Streptomycin Sulfate* dalam *saline* 0,85%
24. *Periodic Acid*

25. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
26. *See BluePlus2 pre-stain standart (Invitrogen, Carlsbad, CA)*
27. *Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%.*
28. *TEMED Electrophoresis grade*
29. *Tris HCL*
30. *Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane (Qbiogene)*
31. *Trypan blue (Sigma)*
32. *Xylitol dari Lotte, Jepang*

4.6.3 Cara Kerja Penelitian

4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

a) Sterilisasi Alat dan Bahan

Mortar, pestle, tip, botol Schoot, jarum ekstirpasi, pinset, gagang skalpel, larutan NaCl 0,9% dalam botol Schoot, larutan PBS dalam botol Schoot, miliQ water dalam botol Schoot, dan Eppendorf tube disterilisasi dengan *autoclave* (120 °C) sekitar 20 menit.

b) Pembuatan Medium Kultur Lengkap (dilakukan dalam keadaan steril di dalam *biohazard cabinet*)

Bubuk DMEM dilarutkan dalam *miliQ water* pada botol Schoot 1000 ml, lalu ditambahkan *Penicillin Streptomycin 10%* (2 units/ml *Penicillin G Sodium* dan 2 µg/ml *Streptomycin Sulfate*), *Fungizone 10%* (*Amphotericin B 0,05 UG/ml*), dan NaHCO_3 (2 g/L). Larutan tersebut harus memiliki pH lebih kurang 7,6. Setelah jadi, larutan tersebut sebanyak 45 ml dimasukkan ke dalam *tube* 50 ml dan ditambahkan FBS 10% (5 ml). Campuran tersebut disaring di dalam *tube* 50 ml baru dengan menggunakan *syringe* 50 ml dan '*Sartorius*'

Minisart single use syringe filter sterile-EO (0,20 μm). Hasil saringan disimpan pada suhu 4 °C.

4.6.3.2 Koleksi Sel-sel Pulpa Gigi

Sel-sel pulpa gigi diperoleh dari gigi utuh tanpa karies yang baru diekstraksi kurang dari enam jam. Segera setelah diekstraksi, gigi tersebut direndam di dalam botol plastik kecil berisi larutan fisiologis NaCl 0,9% yang diletakkan di dalam kotak es. Jaringan lunak yang melekat pada gigi dibersihkan dengan menggunakan pisau skalpel. Gigi dipecahkan dengan *mortar-pestle* untuk mendapatkan jaringan pulpa yang terdapat pada ruang pulpa. Jaringan pulpa diambil dengan jarum ekstirpasi, dipisahkan dari serpihan gigi, lalu diletakkan di dalam medium kultur pada cawan petri.

4.6.3.3 Kultur Sel-sel Pulpa Gigi (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)

Jaringan pulpa gigi yang telah dikoleksi dihancurkan sehalus mungkin dengan menggunakan pisau skalpel dan *dipipetting*. Medium berisi sel pulpa gigi tersebut dipindahkan ke dalam *tube* 15 ml, dan kemudian disentrifugasi 2 kali selama 10 menit pada suhu 24 °C dan kecepatan 2000 G. Setelah itu *supernatant* dibuang. Tambahkan medium kultur lengkap ke dalam *tube* dan campur dengan *pellet*. Sel pulpa tersebut dikultur pada sejumlah cawan petri hingga terlihat sel tumbuh padat merata (*confluent*). Setelah itu, sel pulpa tersebut dipanen dengan menggunakan *cell scrapper*, diberi medium kultur lengkap yang baru, dan dikoleksi ke dalam *tube* 15 ml. *Tube* tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2000 G selama 10 menit pada suhu 24 °C.

Supernatant yang terbentuk dibuang dan *pellet* dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap. Jumlah sel pada setiap mililiter sampel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop perbesaran 4x/0,10. Setelah itu kultur sel pulpa dilakukan kembali pada *24-well plate* dengan jumlah sel pada setiap *well* adalah 2×10^5 sel. Selama satu malam, kultur sel pulpa gigi tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C, 5% CO₂.

4.6.3.4 Pemaparan Xylitol dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, 16% pada Kultur Sel-sel Pulpa Gigi

Hasil kultur sel pulpa dipaparkan dengan xylitol berkonsentrasi 2%, 8%, 16% dan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C, 5% CO₂ selama semalam.

4.6.3.5 Pengukuran Viabilitas sel dengan MTT Assay

Plate dikeluarkan untuk kemudian ditambahkan ke dalam tiap *well* larutan MTT sebanyak 50µl. *Plate* diinkubasi lagi selama tiga jam pada suhu 37 °C, 5% CO₂. Setelah itu, ke dalam tiap *well* ditambahkan 500 µl *acidified isopropanol*. *Plate* diletakkan ke dalam *orbital shaker* pada kecepatan 100 rpm selama satu jam, kemudian ditambahkan 200 µl sampel ke tiap *well* sesuai peta yang telah dibuat sebelumnya. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* (490 nm).

4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Sel dengan SDS-PAGE

a) Persiapan alat dan bahan

Perlengkapan SDS PAGE seperti bak elektroforesis, plat kaca, sisir, dan *guidance* (sudah dibersihkan

dengan alkohol) dipersiapkan. Larutan *resolving gel* dan *stacking gel* dibuat. Setelah selesai dibuat, larutan *resolving gel* dimasukkan terlebih dahulu ke dalam celah di antara plat kaca hingga batas atas *resolving gel*. Selanjutnya, *aquadest* dimasukkan di atasnya untuk menghindari pengerutan dan hasil gel yang bergelombang. *Gel* dibiarkan hingga mengeras. Setelah *aquadest* dihisap dengan kertas hisap, larutan *stacking gel* dimasukkan ke atas *resolving gel*. Segera setelah dimasukkan, sisir pembentuk *well* diletakkan dalam posisi tegak. *Gel* dibiarkan selama satu jam hingga mengeras. Setelah itu, sisir diangkat perlahan dan plat kaca dimasukkan ke dalam bak elektroforesis. Kemudian bak elektroforesis diisi dengan SDS *reservoir buffer* sampai *gel* terendam seluruhnya.

b) Persiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah sebanyak 240 µg protein dari masing-masing kelompok sampel. Sampel sel yang terpilih disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 24 °C dengan kecepatan 2000 G. Setelah terpisah dengan *pellet*, *supernatant* dipindahkan ke dalam masing-masing Eppendorf *tube* baru. *Native sample buffer* ditambahkan ke dalam tiap Eppendorf *tube* yang berisi sampel (1:1). Selanjutnya sampel dipanaskan dengan menggunakan *Thermo-block* 100 °C selama 10 menit.

c) Proses elektroforesis

See BluePlus2 pre-stain standart dimasukkan ke dalam salah satu *well* sebanyak 10 µl. Kemudian 20 µl sampel sel dimasukkan ke tiap *well* pada *gel*.

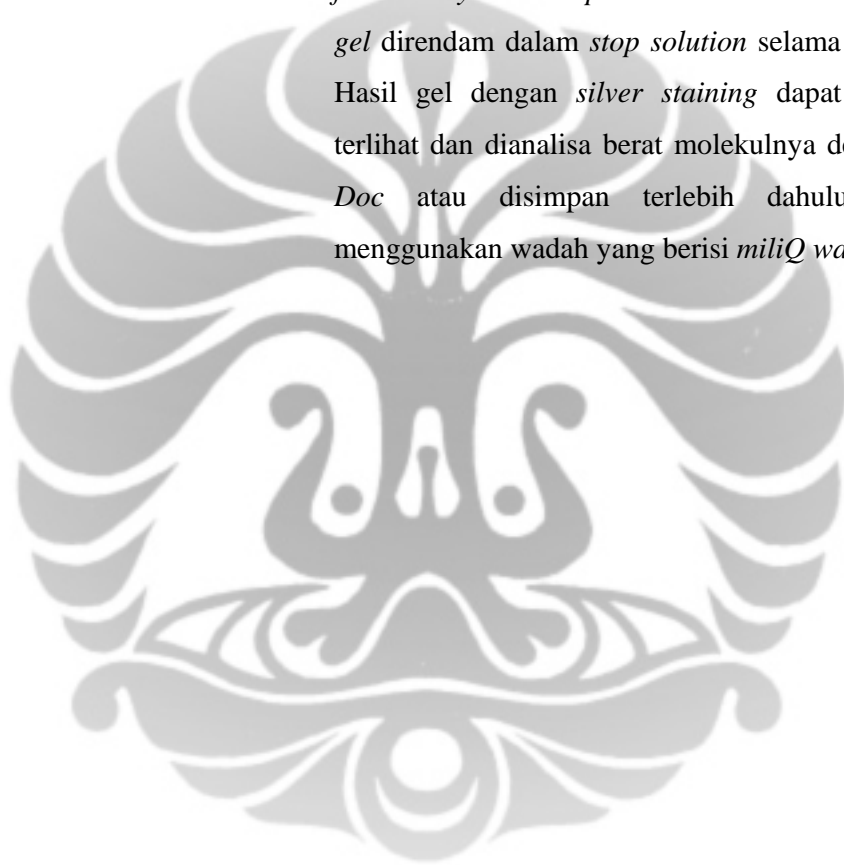
Proses elektroforesis dilakukan sebanyak dua tahap, yaitu P1 dan P2. P1 selama 30 menit dengan kondisi arus sebesar 80 mA, tegangan 100 V, dan daya 30 W, dan P2 selama 2 jam dengan kondisi arus sebesar 100 mA, tegangan 100 V, dan daya 80 W.

d) Proses pewarnaan

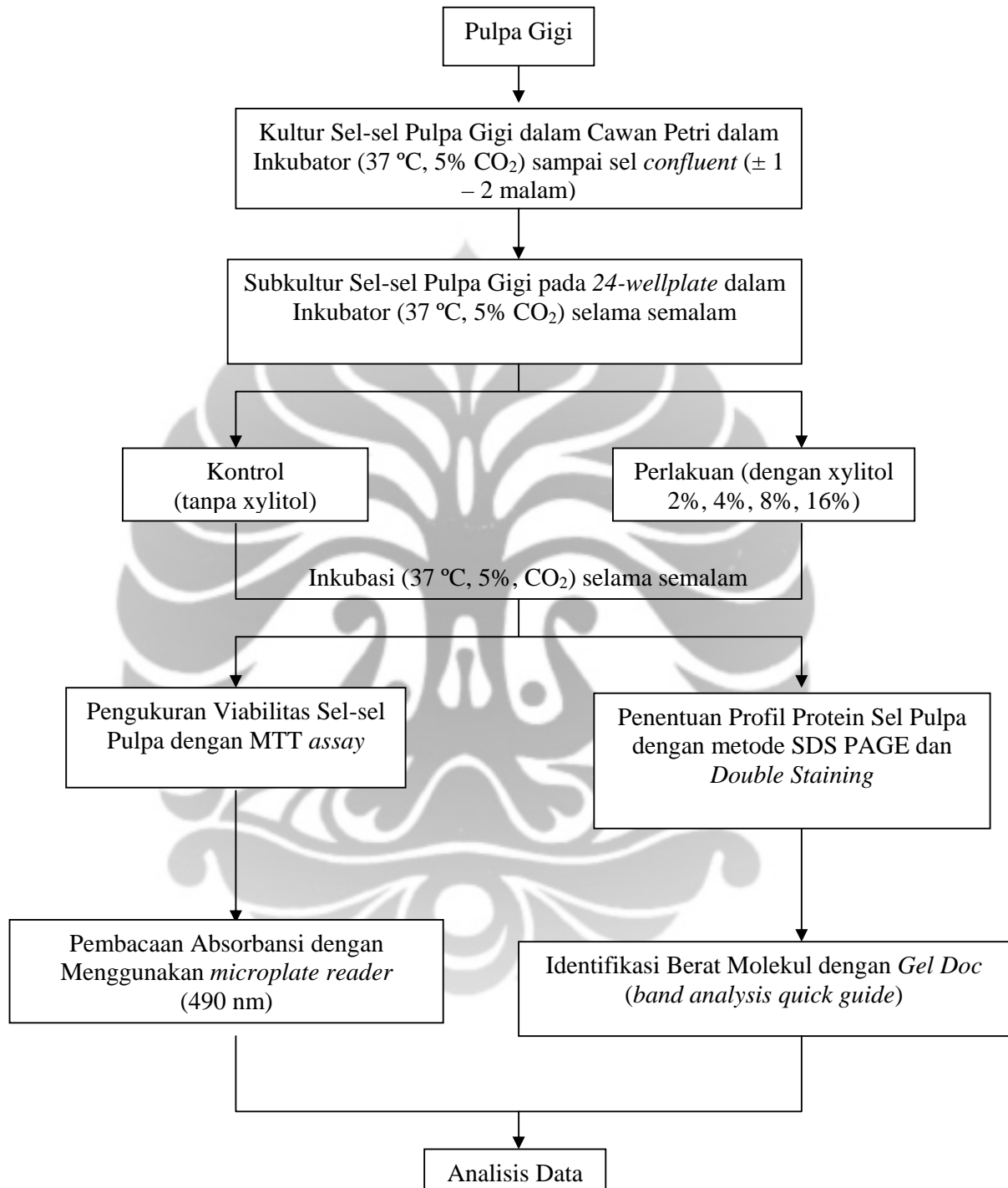
Setelah proses elektroforesis selesai, plat kaca dikeluarkan dari dalam bak elektroforesis. Kemudian *gel* dikeluarkan dari plat kaca secara hati-hati. *Gel* hasil elektroforesis diberi pewarnaan. Pewarnaan dilakukan sebanyak 2 kali (*double staining*), yaitu dengan *Coomassie blue staining* dan dilanjutkan dengan *silver staining*. Pewarnaan dengan *Coomassie blue* dilakukan selama 1 malam diatas *orbital shaker* 40 rpm. Kemudian, pencucian dengan *destaining solution* dilakukan sebanyak 2 kali, masing-masing selama 30 menit di atas *orbital shaker* 40 rpm. Sebelum *silver staining*, lima macam larutan yang dibutuhkan harus disiapkan terlebih dahulu, yaitu:

- *fixing solution*, yang terbuat dari 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *oxidising solution*, yang terbuat dari 0,7% *periodic acid* dalam 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *staining reagent*, yang terbuat dari 18% 0,2M NaOH, 1.3% NH₄OH, dan 3.3% AgNO₃ 20%
- *formaldehyde developer*, yang terbuat dari *formaldehyde* 37% dan asam sitrat
- *stop solution*, yang terbuat dari Tris base dan 80% asam asetat.

Gel direndam dalam *fixing solution* selama 60 menit. Kemudian, *gel* direndam dengan *oxidising solution* selama 10 menit lalu dicuci sebanyak 2 kali dengan *miliQ water* selama masing-masing 10 menit. Setelah itu *gel* direndam dengan *staining reagent* selama 7 menit diatas *orbital shaker* 70 rpm lalu dicuci dengan *miliQ water* sebanyak 1 kali selama 1 menit. Selanjutnya, *gel* direndam dalam *formaldehyde developer* selama 3 menit. Kemudian, *gel* direndam dalam *stop solution* selama 30 menit. Hasil *gel* dengan *silver staining* dapat langsung terlihat dan dianalisa berat molekulnya dengan *Gel Doc* atau disimpan terlebih dahulu dengan menggunakan wadah yang berisi *miliQ water*.



4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Uji beda rerata *optical density* (OD) sel-sel pulpa gigi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan dianalisis dengan uji statistik *Oneway* ANOVA. Analisis profil protein dilakukan secara kualitatif.

4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh surat lolos uji etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian FKG UI dengan nomor surat : 69/Ethical Clearance/II/FKGUI/2008.

