

## **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 sel-sel pulpa gigi sehat yang baru diekstraksi di RSGM-P Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan bagian Bedah Mulut RSCM dengan indikasi ekstraksi untuk perawatan orthodonti. Sedangkan bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah TEGDMA produksi Sigma.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan Juni 2008 sampai Agustus 2008.

#### **4.4 Variable Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

TEGDMA dengan konsentrasi 4 mM, 8 mM, dan 12 mM.

##### **4.4.2 Variable Terikat**

Profil protein dan Viabilitas sel-sel pulpa gigi.

#### **4.5 Definisi Operasional**

**4.5.1 Sel-sel Pulpa gigi** adalah sel-sel yang didapatkan dari jaringan dalam pulpa gigi, kemudian dilakukan pembiakan dengan kultur sel. Dalam penelitian ini gigi didapat dari gigi hasil ekstraksi (kurang dari 6 jam) dengan indikasi orthodonti yang tidak karies.

**4.5.2** *Triethylene glycol dimethacrylate* (TEGDMA) adalah monomer dimetakrilat yang terkandung dalam resin komposit sebagai bahan pengencer. Dalam penelitian ini digunakan TEGDMA (Sigma, USA) dengan konsentrasi 4 mM, 8 mM dan 12 mM.

**4.5.3** **Profil protein sel** adalah gambaran *band-band* berbagai protein dalam sel pulpa (kualitatif) yang merupakan hasil SDS-PAGE dan diwarnai dengan *double staining* (*Coomassie blue* dan *Silver Staining*). Berat molekul *band-band* protein sel pulpa diketahui berdasarkan berat molekul protein standar *See Blue Plus*.

**4.5.4** **Viabilitas sel** adalah vitalitas sel yang diukur berdasarkan *MTT assay*, yaitu suatu metode untuk mengukur aktivitas mitokondria berdasarkan reaksi enzim *succinic dehydrogenase* dengan garam *methylthiazol tetrazolium*. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari kuning menjadi ungu, sebanding dengan aktivitas sel yang hidup. Perubahan warna yang terjadi diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm.

## **4.6** **Alat, Bahan, dan Cara Kerja**

### **4.6.1** **Alat**

1. Botol *Schott*
2. *Mortar* dan *pestle*
3. Skalpel
4. Pinset
5. Jarum ekstirpasi
6. *Tube* 15 ml (Corning 430791, USA)
7. *Tube* 50 ml (Corning 430829, USA)
8. *Eppendorf* tube
9. Tip *Micropipet*
10. *Micropipet* (*Eppendorf*, German)
11. Finnpiquette (Labsystems dan BIOHT-Proline)

12. *Pipette Pasteur*
13. *Petri dish* (CORNING)
14. *Cell scrapper* (NUNC, Denmark)
15. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
16. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
17. *Syringe 1 ml dan 50 ml* (Terumo)
18. '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20  $\mu\text{m}$ )
19. Alat-alat SDS-PAGE terdiri dari : *electrophoresis tank*, sisir, *Bio-rad glass plate*, *guidance*.
20. *Hemocytometer*
21. *Magnetic stirrer*
22. *Thermolyne, stir plate* (Nuova)
23. *Autoclave*
24. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
25. *Biohazard cabinet*
26. Inkubator (Memert)
27. pH Meter MP 220 (METTLER TOLEDO)
28. *Explorer Balance* (Ohaus Corp, USA)
29. *Adventurer Balance* (Ohaus Corp, USA)
30. BR-2000 Vortexer (Bio-Rad)
31. *Mini Centrifuge* (Bio-Rad)
32. Sentrifugator (SORVALL)
33. *Water bath* (CERTOMAT, Biotech International)
34. *Orbital Shaker* (CERTOMAT, Biotech international)
35. *Thermo-block NB-305TB* (N-BIOTEK, INC)
36. *Microplate reader* (Bio-Rad)
37. *Electrophoresis Power Supply – EPS 601* (amersham pharmacia biotech)
38. *White Light 2000* (Bio-Rad)
39. GEL DOC 2000, Chemi Doc (Bio-Rad)
40. Gelas ukur

41. Tabung *Erlenmeyer*
42. Alumunium foil
43. Kertas hisap
44. Label sterilisasi
45. Masker dan gloves

#### 4.6.2 Bahan

1. Gigi sehat yang baru diekstraksi
2. Larutan NaCl 0,9%
3. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
4. 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)
5. *MilliQ water*
6. *Ethanol 70%*
7. *Aquadest*
8. NaHCO<sub>3</sub> 7,5%
9. *Penicillin – Streptomycin* (Gibco, UK) yang mengandung 10.000 Units/ml *Penicillin G Sodium* dan 10.000 µg/ml *Streptomycin Sulfate* dalam *saline 0,85%*
10. *Fungizone* (Amphotericin B 250 UG/ml) produksi Gibco UK
11. *Fetal Bovine Serum* (FBS)
12. TEGDMA 3318mM produksi Sigma
13. Bahan untuk *MTT assay* :
  - a. Larutan MTT 5 mg/ml (Sigma, USA)
  - b. *Acidified Isopropanol* (Isopropanol dengan 0,4 N HCL)
14. *Trypan blue* (Sigma)
15. *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10%.
16. *See BluePlus2 pre-stain standart* (Invitrogen, Carlsbad, CA)
17. *Acrylamide*
18. *Commassie blue*

19. *Methanol*
20. *Acetic Acid*
21. *Ammonium Persulfate ACS Grade*
22. *TEMED Electrophoresis grade*
23. *Native Buffer Sample (BioRad)*
24. *Glycine (Applichem, Darmstadt, German)*
25. *Tris HCL*
26. *Tris(Hydroxymethyl) Aminomethane (Qbiogene)*
27. *Periodic Acid*
28. *0,2 M Natriumhydroxid (MERCK, Darmstadt, German)*
29. *Na<sub>4</sub>OH (Concentrate)*
30. *20% AgNO<sub>3</sub> (MERCK, Darmstadt, German)*
31. *Citric Acid*
32. *37% Formaldehyde*

#### **4.6.3 Cara kerja**

##### **4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan**

###### **A. Sterilisasi Alat dan Bahan**

*Mortar dan pestle*, tip pipet, botol Schoot, jarum ekstripasi, pinset, scalpel, *eppendorf tube*, NaCl 0,9%, dan PBS disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit.

###### **B. Pembuatan Medium Kultur Lengkap (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)**

Bubuk DMEM dilarutkan dengan *MilliQ water*, kemudian ditambahkan *Penicillin Streptomycin*, *Fungizone* dan penambahan NaHCO<sub>3</sub> sampai mencapai pH 7,4. Selanjutnya, medium kultur tersebut dipindahkan ke dalam *tube* 50 ml, tambahkan FBS (10%). Kemudian saring dengan menggunakan *syringe* 50 ml dan '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter*

*sterile-EO* (0,20  $\mu\text{m}$ ). Lalu disimpan dalam lemari pendingin.

#### 4.6.3.2 Sel-sel pulpa

Sel-sel pulpa didapat dari gigi sehat yang baru diekstraksi, dibersihkan lalu direndam dalam larutan garam fisiologis NaCl 0,9%. Gigi dipecahkan dengan mortar dalam pestle, kemudian sel pulpanya diambil dengan jarum ekstirpasi dan diletakkan pada larutan medium dalam petri dish.

#### 4.6.3.3 Kultur Sel-sel Pulpa Gigi (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)<sup>34,46</sup>

Jaringan pulpa yang telah diambil dari gigi dipotong-potong dengan scalpel dan sel dipisahkan dengan cara *pipetting* dalam medium kultur. Kemudian dipindahkan ke dalam *tube* 15 ml untuk disentrifugasi (2000 g) selama 10 menit. Buang *supernatant* dan tambahkan lagi medium kultur pada *pellet* secukupnya dan lakukan pipetting untuk membuat sel terpisah dalam medium. Kultur sampel sel pada petri dish *overnight* dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada kondisi suhu 37<sup>0</sup> C, 5% CO<sub>2</sub>. Lakukan penggantian medium kultur setiap hari, sambil mengamati proliferasi sel dengan mikroskop. Setelah pertumbuhan sel cukup (*confluent*) lakukan pengambilan sel dengan cara *scrapping* dan dimasukkan ke dalam *tube* 15 ml. Kemudian sampel sel disentrifugasi (2000 g) selama 10 menit, setelah itu buang *supernatant*. Kemudian tambahkan sejumlah medium kultur ke dalam *pellet* sampel sel. Lakukan pipetting untuk memisahkan sel dalam larutan medium, dan selanjutnya dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop. Selanjutnya lakukan

subkultur sel ( $2 \times 10^5$  sel/ml) *overnight* dalam 24-wellplate dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.6.3.4 Pemaparan TEGDMA dengan beberapa konsentrasi pada Kultur Sel-sel Pulpa Gigi

Lakukan penggantian medium kultur, kemudian pada kelompok perlakuan dipaparkan dengan TEGDMA konsentrasi 4 mM, 8 mM dan 12 mM. Selanjutnya, sel-sel pulpa gigi diinkubasi *overnight* dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.6.3.5 Pengukuran Viabilitas sel<sup>38</sup>

Aspirasi 500 µl medium kultur sel-sel pulpa dari tiap well dan sisakan 500 µl pada tiap well. Kemudian masukkan 50 µl larutan MTT (5 mg/ml) ke dalam tiap well dan diinkubasi dalam inkubator (suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) selama 3 jam. Selanjutnya tambahkan 500 µl *acidified isopropanol* ke tiap well, lalu diletakan di atas *orbital shaker* (100 rpm) selama 1 jam. Untuk pengukuran absorbansi, dari setiap well diambil 200 µl dan dipindahkan ke dalam 96 *microwell plate* (triplo), lalu dibaca pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm untuk mendapatkan nilai *optical density* (OD). Data ini dapat digunakan untuk pengukuran viabilitas sel dengan perbandingan presentase nilai OD kelompok perlakuan per nilai OD kelompok kontrol.

#### 4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Sel dengan SDS-PAGE<sup>47-48</sup>

- a. Tahap persiapan bahan-bahan dan alat-alat  
Buatlah *resolving gel* dengan pH 6,8 dan *stacking gel* dengan pH 8,8. Siapkan *SDS resevoir buffer*, larutan *Coomassie blue* dan *Destaining solution*. Setelah itu

persiapkan dan bersihkan alat-alat untuk SDS-PAGE yang terdiri dari: *Bio-Rad glass plate*, sisir, *electrophoresis tank*, *guidance*. Siapkan *termoblock* pada suhu 100°C.

b. Pembuatan gel elektroforesis

Masukkan resolving gel dengan pipet Pasteur ke dalam celah *Bio-Rad glass plate* sampai kira-kira 1 cm dari bagian atas kaca. Kemudian tambahkan *aquadest* agar diperoleh gel yang lurus, biarkan selama 20 menit sampai mengeras. Setelah *resolving gel* mengeras, serap *aquadest* dengan kertas serap. Tambahkan *stacking gel* di atas *resolving gel*, masukkan sisir dan biarkan selama 1 jam sampai mengeras. Setelah *stacking gel* mengeras, angkat sisir secara hati-hati agar menghasilkan *well* yang bagus.

c. Persiapan sampel protein dan injeksi sampel protein

Masukkan *Bio-Rad glass plate* ke dalam *electrophoresis tank* dan tambahkan *SDS resevoir buffer*. Pasang *guidance* sebagai panduan untuk injeksi sampel protein ke tiap *well*. Ambil 10 µl sampel protein, masukkan ke dalam *eppendorf* tube dan tambahkan 10 µl sampel Buffer. Kemudian panaskan *eppendorf* tube pada *termoblock* dengan suhu 100° C selama 5 menit. Selanjutnya injeksi sampel protein ke tiap *well* dengan tip *micropipet* dan satu *well* khusus untuk protein standar *See Blue Plus*.

d. Proses running electrophoresis

Proses *running* dilakukan dalam 2 tahap: P1 dan P2. P1 dijalankan selama 30 menit dengan kondisi



electrophoresis power supply (EPS) 100 V, 80 mA, dan 30 W dan dilanjutkan dengan P2 dijalankan selama 2 jam dengan kondisi EPS 100 V, 100 mA, dan 80 W.

e. Proses pewarnaan dan pencucian gel

Setelah selesai proses *running*, lepaskan gel dari *Bio-Rad glass plate* dan rendam dalam larutan *Commassie Blue* dalam wadah tertutup. Letakkan wadah tersebut dalam orbital shaker dengan kecepatan 0,4 rpm *overnight*. Kemudian gel dicuci dengan merendam dalam larutan *destaining*. Letakkan wadah tersebut dalam orbital shaker dengan kecepatan 0,7 rpm selama 2 x 30 menit. Selanjutnya setelah *band-band* telah terlihat, gel diwarnai kembali dengan *silver staining*.

i. *Silver Staining*

*Silver staining* dilakukan untuk memperjelas gambaran *band-band* protein. *Silver staining* menggunakan bahan-bahan: *Fixing solution*, *Oxidising solution*, *Staining reagent*, *Formaldehyde developer*, *Stop solution* dan *MiliQ water*. Fiksasi gel dengan *fixing solution* selama 60 menit, dalam wadah plastik bersih. Kemudian ganti *fixing solution* dengan *oxidising solution* selama 10 menit. Setelah itu cuci dengan *MilliQ water* 2x10 menit, dalam wadah plastik bersih yang baru. Lalu buang *MilliQ water* dan ganti dengan *Staining Reagent* maksimal 7 menit. Kemudian cuci dengan *MilliQ water* selama 1 menit dan ganti *MiliQ water* dengan *Formaldehyde Developer* selama 3 menit. Setelah itu ganti *Formaldehyde Developer* dengan *Stop Solution* selama 30 menit. Pada setiap proses penggantian bahan-bahan tersebut, segera sesudahnya letakkan wadah

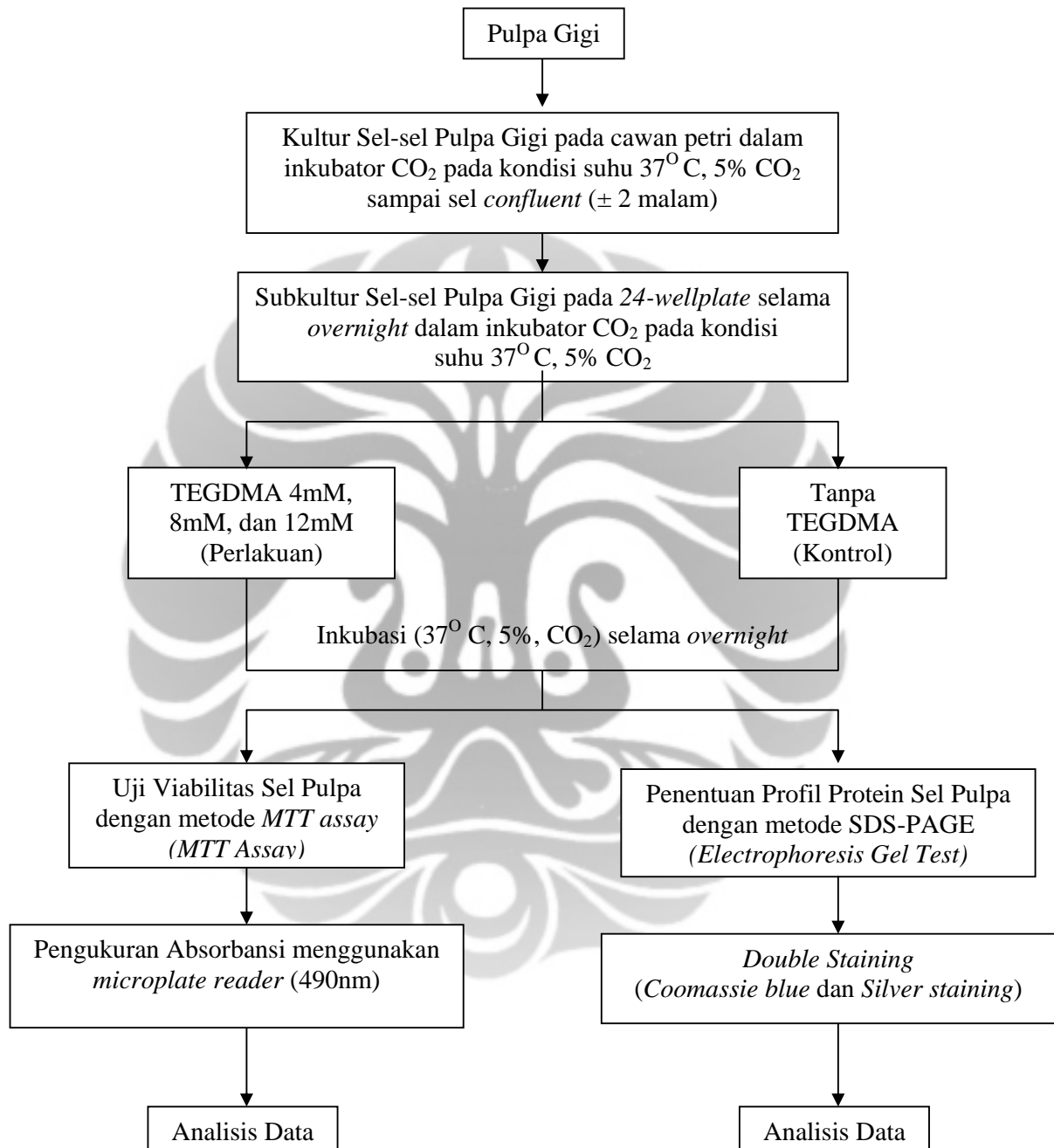
plastik pada *orbital shaker* dengan kecepatan 50 rpm kecuali penggantian *staining reagent* dengan kecepatan 70 rpm. Terakhir, cuci dan simpan gel dengan *MilliQ water* dalam container plastik bersih yang baru untuk untuk tahapan analisa berikutnya.

ii. *Gel Doc*

Proses analisa gambar *band-band* protein pada gel dilakukan dengan alat *Gel Doc*. Gel diletakkan ke dalam alat *Gel Doc* di atas plastik bening dalam nampan putih *White Light*. Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan *Band Analysis Quick Guide*.



#### 4.7 Alur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Perbedaan viabilitas sel antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Analisis gambaran *band-band* protein dilakukan secara kualitatif. Berat molekul dari *band-band* yang muncul diketahui berdasarkan berat molekul protein standar *See Blue Plus*.

#### 4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh surat lolos etik penelitian FKG UI pada tanggal 11 April 2008.

