

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Eksperimental Laboratorik.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil subkultur sel-sel pulpa yang berasal dari gigi manusia yang utuh, bebas karies, dan baru diekstraksi (<6 jam). Gigi tersebut diperoleh dari RSGM-P Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan bagian Bedah Mulut RSCM dengan indikasi ekstraksi, misalnya untuk perawatan orthodonti. Sedangkan bahan yang diuji pada 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 Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan Juni sampai Agustus 2008.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variable Bebas

- ✓ Xylitol dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%.

4.4.2 Variable Terikat

- ✓ Protein total sel-sel pulpa gigi.
- ✓ Profil protein sel-sel pulpa gigi.

4.5 Definisi Operasional

- #### 4.5.1 Xylitol
- merupakan gula alkohol (*polyols*) yang mempunyai lima ikatan rantai karbon dengan rumus kimia $C_5H_{12}O_5$. Dalam

penelitian ini digunakan xylitol (Lotte, Jepang) dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%.

4.5.2 Sel-sel Pulpa Gigi adalah sel-sel pulpa gigi sehat manusia yang baru diekstraksi (<6 jam). Sel-sel yang dipakai adalah sel-sel pulpa gigi hasil kultur primer.

4.5.3 Protein Total Sel adalah jumlah protein total yang terkandung di dalam sel-sel pulpa gigi hasil subkultur. Protein total sel diukur pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 655 nm dengan metode *Bradford assay*. Nilai protein total yang diperoleh memiliki satuan $\mu\text{g/ml}$.

4.5.4 Profil Protein Sel adalah tampilan protein berupa garis-garis pada *gel* elektroforesis yang disebut *band*. *Band-band* tersebut terbentuk dari kumpulan protein yang berkelompok berdasarkan berat molekulnya akibat proses elektroforesis dalam prosedur SDS PAGE (*Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*).

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. *Autoclave*
5. *Cell scrapper*
6. *Biohazard cabinet*
7. Botol Schott
8. BR-2000 *Vortexer* (Bio-Rad)
9. *Electrophoresis Power Supply* – EPS 601 (amersham pharmacia biotech)
10. Eppendorf *Tube*
11. PP microcentrifuge 1,5 mL

12. *Explorer Balance* (Ohaus Corp, USA)
13. *Finnpipette* (Labsystems)
14. *Finnpipette* (BIOHT-Proline)
15. Gelas ukur
16. GEL DOC 2000, Chemi Doc (Bio-Rad)
17. *Hemocytometer*
18. Inkubator (Memert)
19. Jarum ekstirpasi
20. *Magnetic stirrer*
21. *Microplate reader* (Bio-Rad)
22. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
23. *Mini Centrifuge* (Bio-Rad)
24. *Mortar dan pestle*
25. *Orbital Shaker* (CERTOMAT, Biotech international)
26. *Petri dish* (CORNING)
27. pH Meter MP 220 (METTLER TOLEDO)
28. Pipet (Eppendorf, German)
29. *Pipette Pasteur*
30. 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 μm)
31. Sentrifugator (SORVALL)
32. *Syringe 1 ml* (Terumo)
33. *Syringe 50 ml* (Terumo)
34. Tabung *Erlenmeyer*
35. Thermo-block NB-305TB (N-BIOTEK, INC)
36. Timbangan elektronik
37. Tip
38. *Tube*
39. *Water bath* (CERTOMAT, Biotech International)
40. White Light 2000 (Bio-Rad)

4.6.2 Bahan Penelitian

1. *Acetic Acid*
2. *Acrylamide*
3. AgNO_3 20% (MERCK, Darmstadt, German)
4. *Ammonium Persulfate ACS Grade*
5. *Aquadest*
6. *Citric Acid*
7. *Coomassie blue*
8. *Ethanol 70%*
9. *Fetal Bovine Serum (FBS)*
10. *Formaldehyde 37%*
11. *Fungizone (Amphotericin B 250 UG/ml) produksi Gibco UK*
12. Gigi sehat bebas karies yang baru diekstraksi
13. *Glycine (Applichem, Darmstadt, German)*
14. *HEPES Buffer solution 10mM*
15. Larutan *Bradford* produksi Bio-Rad
16. Larutan NaCl 0,9%
17. *Lysozyme 5 mg/ml (Roche)*
18. Medium Kultur: Bubuk *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)* high glucose dan mengandung: *L-Glutamine*, 110 mg/l *Sodium Pyruvate*, dan *Pyridoxine Hydrochloride* (Gibco, UK)
19. *Methanol*
20. *MilliQ water*
21. Na_4OH (*Concentrate*)
22. NaHCO_3 7,5%
23. *Native Sample Buffer* (BioRad)
24. *Sodiumhydroxide 0,2 M* (MERCK, Darmstadt, German)
25. *Penicillin – Streptomycin* (Gibco, UK) yang mengandung 10.000 Units/ml *Penicillin G Sodium* dan 10.000 $\mu\text{g/ml}$ *Streptomycin Sulfate* dalam *saline 0,85%*
26. *Periodic Acid*

27. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
28. Protein standar *bovine serum albumin (BSA)* 75.000 µg/ml produksi GIBCO
29. *See BluePlus2 pre-stain standart (Invitrogen, Carlsbad, CA)*
30. *Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)* 10%.
31. TEMED *Electrophoresis grade*
32. *Tris HCL*
33. *Tris (Hydroxymethyl)Aminomethane (Qbiogene)*
34. *Trypan blue (Sigma)*
35. *Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)*
36. *Xylitol (Lotte, Jepang)*

4.6.3 Cara Kerja Penelitian

4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

a) Sterilisasi Alat dan Bahan

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

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

Bubuk DMEM dalam *miliQ water* dilarutkan pada botol Schoot, lalu ditambahkan *Penicillin Streptomycin* 10% (2 units/ml *Penicillin G Sodium* dan 2µg/ml *Streptomycin Sulfate*), *Fungizone* 10% (*Amphotericin B* 0,05 UG/ml), NaHCO_3 (2 g/L), dan FBS (10%). Kemudian medium kultur lengkap tersebut dipindahkan ke *tube* 50 ml lalu disterilisasi dengan cara disaring menggunakan *syringe* 50 ml dan 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 µm).

c) Pembuatan Protein Standar BSA

Protein standar BSA disiapkan dalam konsentrasi 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1600 µg/ml, dan 3200 µg/ml dengan pelarut PBS, kemudian disimpan dalam kotak yang berisi es.

d) Pembuatan HEPES 10 mM

HEPES dibuat dalam konsentrasi 10 mM dengan penambahan pelarut PBS.

4.6.3.2 Koleksi Sel-sel Pulpa Gigi

Sel-sel pulpa gigi didapatkan dari gigi utuh bebas karies yang baru diekstraksi kurang dari 6 jam. Kemudian, gigi tersebut direndam dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% yang ditempatkan didalam kotak yang berisi es. Setelah itu, jaringan lunak yang melekat pada gigi dibuang dengan pisau skalpel. Gigi dipecahkan dengan *mortar-pestle* untuk memperoleh jaringan pulpa gigi yang terdapat pada ruang pulpa gigi. Jaringan pulpa gigi diambil dengan jarum ekstirpasi, dipisahkan dari serpihan gigi, dan dikultur 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. Kemudian sel pulpa gigi beserta medium dipindahkan seluruhnya kedalam *tube* 15 ml lalu disentrifugasi 2 kali selama 10 menit pada suhu 24°C dan kecepatan 2000 G. Kemudian *supernatant* dibuang dan *pellet* yang tersisa dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap. Sampel tersebut dikultur pada sejumlah *petri dish* selama semalam atau sampai terlihat sel tumbuh padat merata (*confluent*). Kemudian sel dipanen dengan menggunakan *cell scrapper*, diberi medium kultur lengkap yang baru, dan dikoleksi ke dalam *tube* 15 ml,

lalu *tube* tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2000 g selama 10 menit pada suhu 24°C. *Supernatant* dibuang dan *pellet* yang mengendap dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap. Kemudian, jumlah sel dihitung menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop (perbesaran 4x/0,10). Selanjutnya sel-sel pulpa gigi dikultur kembali pada *24-well plate* dengan jumlah sel pada setiap *well* adalah 2×10^5 sel. Selama 1 malam, kultur sel pulpa gigi tersebut diinkubasi pada suhu 37° C dan 5% CO₂.

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

Sebelum pemaparan dilakukan, medium kultur lengkap sel diganti dengan yang baru. Kemudian dipaparkan dengan xylitol berkonsentrasi 2%, 4%, 8%, 16%. Selanjutnya, *plate* tersebut diinkubasikan kembali pada suhu 37° C dan 5% CO₂ selama 1 malam.

4.6.3.5 Pengukuran Protein Total Sel dengan Bradford Protein Assay

a) Persiapan sampel

Setelah diinkubasi, seluruh medium kultur pada *24-well plate* dibuang. Trypsin EDTA dimasukkan sebanyak 200 µl ke dalam setiap *well* untuk melepaskan sel dari dasar *plate*, ditunggu selama 5 menit, kemudian PBS ditambahkan sebanyak 300 µl ke dalam setiap *well*. Setelah itu, kultur sel dipindahkan dari masing-masing *well* ke dalam sejumlah *tube*, lalu disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 24°C dengan kecepatan 3000 G untuk mendapatkan *pellet*. *Supernatant* dibuang pada masing-masing *tube* lalu *pellet* dilarutkan dengan 1ml HEPES 10 mM. Setelah itu masing-masing *tube*

dipanaskan pada *Thermo-block* 100°C selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi kembali selama 10 menit pada suhu 24°C dengan kecepatan 3000 G per menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan 1000 µl PBS ditambahkan ke dalam *pellet*. Selanjutnya, ditambahkan 65 µl SDS 10% lalu semua *tube* dimasukkan ke dalam *water bath* (37°C) selama 5 menit.

b) Bradford Assay

sampel sel pulpa 160 µl dan larutan protein standard BSA dengan konsentrasi 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1600 µg/ml, dan 3200 µg/ml dimasukkan kedalam *96-well plate* (triplo). Kemudian, 40 µl larutan Bradford ditambahkan ke masing-masing *well* dan biarkan selama 20 menit. Protein total sel dibaca pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 655 nm.

4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Sel dengan SDS PAGE

a) Persiapan alat dan bahan

Perlengkapan SDS PAGE dipersiapkan seperti bak elektroforesis, plat kaca, sisir, dan *guidance*. Kemudian, larutan *resolving gel* 1,5% dan *stacking gel* 1,5% dibuat. Larutan *resolving gel* dimasukkan terlebih dahulu ke dalam celah diantara plat kaca sampai batas atas yang ditentukan. Selanjutnya, aquades dimasukkan di atasnya agar diperoleh hasil *gel* yang tidak bergelombang. *Gel* didiamkan sekitar 20 menit hingga mengeras, lalu *aquadest* dihisap dengan kertas hisap, lalu larutan *stacking gel* dimasukkan diatas *resolving gel* dan diletakkan segera sisir pembentuk *well*. *Gel* dibiarkan selama sekitar 1 jam hingga mengeras. Setelah *gel* mengeras, sisir

diangkat perlahan dan plat kaca tersebut dimasukkan ke dalam bak elektroforesis. Bak elektroforesis diisi dengan *SDS reservoir buffer* sampai *gel* terendam seluruhnya.

b) Persiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah sampel yang digunakan juga pada *Bradford Protein Assay*. Sejumlah 240 µg protein dari tiap kelompok sampel dimasukkan kedalam masing-masing Eppendorf *tube* dan diikuti dengan penambahan *native sample buffer* (1:1). Sample sel yang terpilih disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 24°C dengan kecepatan 5000 G. Setelah *pellet* dan *supernatant* terpisah, *supernatant* dibuang dan *pellet* dipindahkan pada *tube* baru. Kemudian *native sample buffer* dimasukkan dengan perbandingan 1:1 pada setiap *tube*. Selanjutnya untuk denaturasi kandungan protein sel, sampel dipanaskan pada *Thermo-block* 100°C selama 10 menit.

c) Proses elektroforesis

See BluePlus2 *pre-stain standard* 10 µl dimasukkan pada salah satu *well* sebagai standar berat molekul protein, kemudian dimasukkan sampel masing-masing 20 µl sel ke setiap *well* pada *gel*. Kemudian, elektroforesis dijalankan dalam 2 tahap yaitu: tahap P1 selama 30 menit, arus sebesar 80 mA, tegangan 100 V, dan daya 30 W. kemudian dilanjutkan dengan tahap P2 selama 2 jam, 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* dilepaskan dari plat kaca secara hati-hati. Setelah

itu *gel* hasil elektroforesis diberi pewarnaan. Pewarnaan dilakukan sebanyak 2 tahap (*double staining*), yaitu dengan *coomassie blue* dan dilanjutkan dengan *silver staining*. Pewarnaan dengan *coomassie blue* dilakukan selama 1 malam diatas *orbital shaker* 40 rpm. Kemudian, dilakukan pencucian dengan *destaining solution* sebanyak 2 kali, masing-masing selama 30 menit di atas *orbital shaker* 40 rpm. Sebelum *silver staining* dilakukan, disiapkan 5 macam larutan yang dibutuhkan, yaitu:

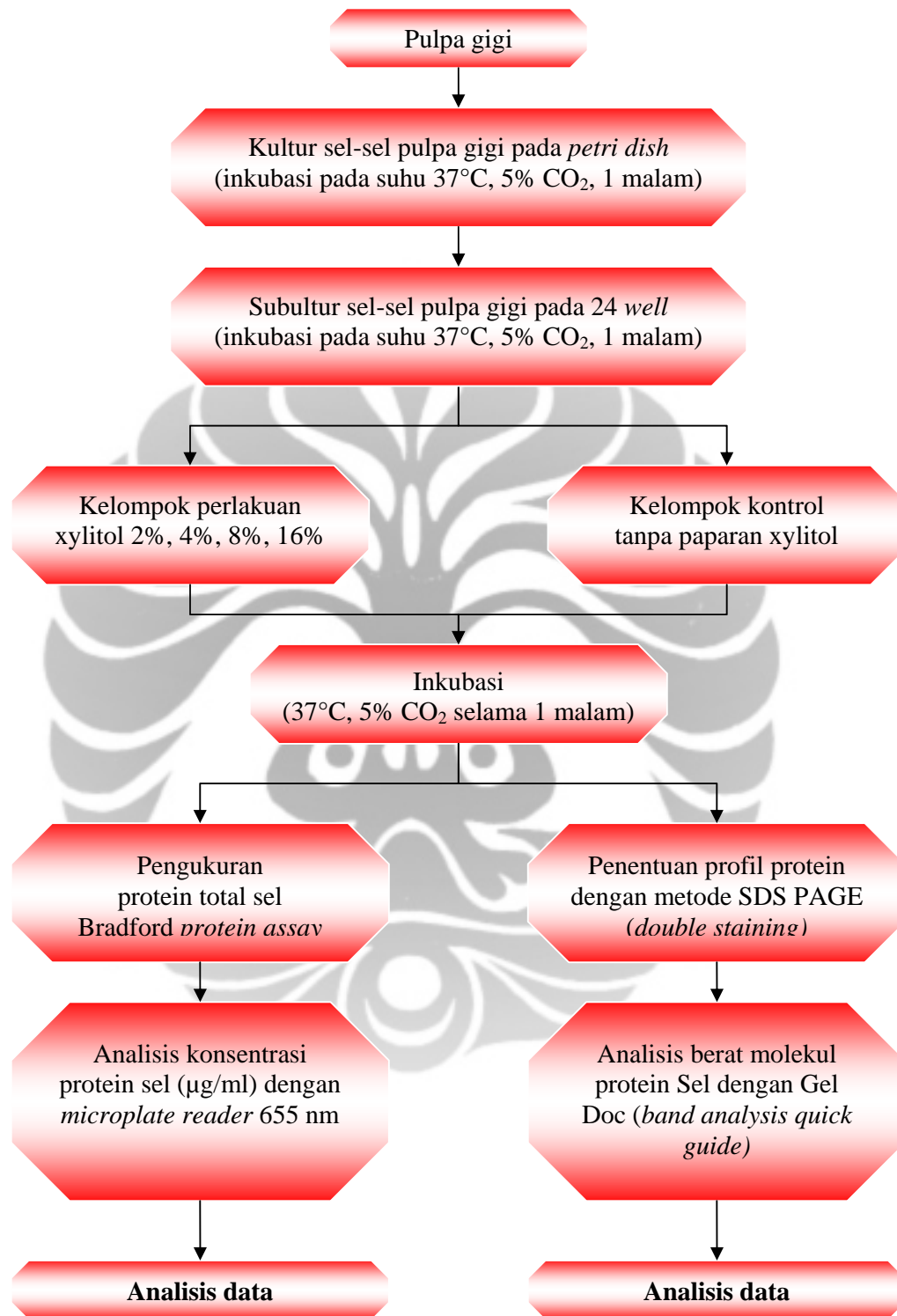
- *fixing solution*, yang terbuat dari 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *oxidising solution*, yang terbuat dari 0,7% *periodic acid* dalam 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *staining reagent*, yang terbuat dari 18% 0,2M NaOH, 1,3% NH₄OH, dan 3,3% AgNO₃ 20%
- *formaldehyde developer*, yang terbuat dari *formaldehyde* 37% dan asam sitrat
- *stop solution*, yang terbuat dari *Tris base* dan 80% asam asetat.

Gel direndam dengan *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 cuci dengan *miliQ water* sebanyak 1 kali selama 1 menit. Selanjutnya, direndam dalam *formaldehyde developer* selama 3 menit. Kemudian, direndam dalam *stop solution* selama 30 menit. Hasil *gel* dengan *silver staining* dapat langsung terlihat dan dapat langsung

dianalisis dengan Gel Doc atau disimpan terlebih dahulu dengan menggunakan wadah yang berisi miliQ water.



4.7 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

- Uji beda mean konsentrasi protein total sel antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan xylitol dan antar kelompok perlakuan dengan uji statistik *Oneway ANOVA*.
- Analisis profil protein sel dilakukan secara kualitatif.

4.10 Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapat surat lolos etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dengan Nomor: 69/Etichal Clearance/II/FGGUI/2008.

