

## 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, misalnya untuk perawatan ortodonti. 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 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

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

#### 4.4.2 Variabel Terikat

Protein total dan profil protein kultur sel-sel pulpa gigi.

### 4.5 Definisi Operasional

**4.5.1 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.

**4.5.2 Sel pulpa** adalah sel-sel pulpa, yang didapat dari kultur sel pulpa gigi sehat yang baru diekstraksi.

**4.5.3 Protein total sel** adalah protein total sel pulpa gigi. Protein total diukur dengan *Bradford protein assay* dan hasilnya dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 655 nm. Nilai protein total yang diperoleh memiliki satuan  $\mu\text{g/ml}$ .

**4.5.4 Profil protein sel** adalah tampilan *band-band* protein pada gel elektroforesis dari jenis-jenis protein sel dalam berat molekul tertentu yang dihasilkan dari teknik *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

## 4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

### 4.6.1 Alat

1. *Tube* 15 ml (Corning 430791, USA)
2. *Tube* 50 ml (Corning 430829, USA)
3. *Tube Eppendorf*
4. Tip
5. Pipet (Eppendorf, German)
6. Finnpiquette (Labsystems dan BIOHT-Proline)
7. *Pipette Pasteur*
8. Cawan petri (CORNING)
9. *Cell scrapper*
10. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
11. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
12. 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20  $\mu\text{m}$ )
13. Alat-alat SDS-PAGE terdiri dari : *electrophoresis tank*, sisir, *Bio-rad glass plate*, *guidance*.
14. *Hemocytometer*
15. *Magnetic stirrer*
16. *Thermolyne, stir plate* (Nuova)
17. *Autoclave*
18. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
19. *Biohazard cabinet*

20. Inkubator (Memert)
21. pH Meter MP 220 (METTLER TOLEDO)
22. BR-2000 Vortexer (Bio-Rad)
23. Sentrifugator (SORVALL)
24. *Water bath* (CERTOMAT, Biotech International)
25. *Orbital Shaker* (CERTOMAT, Biotech international)
26. Thermo-block NB-305TB (N-BIOTEK, INC)
27. *Microplate reader* (Bio-Rad)
28. Electrophoresis Power Supply – EPS 601 (amersham pharmacia biotech)
29. White Light 2000 (Bio-Rad)
30. GEL DOC 2000, Chemi Doc (Bio-Rad)
31. Tabung *Erlenmeyer*

#### 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. Larutan *Bradford* produksi Sigma

14. Protein standar *bovine serum albumin* (BSA) 75.000 µg/ml produksi GIBCO
15. *Trypan blue* (Sigma)
16. *Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA)
17. *HEPES Buffer solution* 10mM
18. *Lysozyme* 5 mg/ml (Roche)
19. *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10%.
20. *Acrylamide*
21. *Coomassie Brilliant blue*
22. *Methanol*
23. *Acetic Acid*
24. *Ammonium Persulfate ACS Grade*
25. *TEMED Electrophoresis grade*
26. *Native Sample Buffer* (BioRad)
27. *Glycine* (Applichem, Darmstadt, German)
28. *Tris HCL*
29. *Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane* (Qbiogene)
30. *Periodic Acid*
31. 0,2 M *Natriumhydroxid* (MERCK, Darmstadt, German)
32.  $\text{Na}_4\text{OH}$  (*Concentrate*)
33. 20%  $\text{AgNO}_3$  (MERCK, Darmstadt, German)
34. *Citric Acid*
35. 37% *Formaldehyde*
36. *See BluePlus2 pre-stain standart* (Invitrogen, Carlsbad, CA)

### 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 ekstirpasi, pinset, *handle*, NaCl 0,9%, PBS, tip, dan *tube Eppendorf* disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit.

Universitas Indonesia

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

DMEM bubuk dilarutkan dengan *MilliQ water* sesuai petunjuk pabrik, kemudian ditambahkan  $\text{NaHCO}_3$  (2 g/L), *Penicillin Streptomycin* 10% (2 units/ml *Penicillin G Sodium* dan 2 $\mu\text{g/ml}$  *Streptomycin Sulfate*), *Fungizone* 10% (*Amphotericin B* 0,05 UG/ml), dan FBS 10%. Selanjutnya, medium kultur lengkap tersebut disaring dengan '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20  $\mu\text{m}$ ). Lalu disimpan dalam lemari pendingin.

### **C. Pembuatan Protein Standar BSA dengan berbagai konsentrasi**

Protein standar BSA dibuat dalam konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$ , 1600  $\mu\text{g/ml}$ , dan 3200  $\mu\text{g/ml}$  dengan pelarut PBS.

#### **4.6.3.2 Koleksi Sel-sel Pulpa Gigi**

Sel-sel pulpa didapat dari gigi sehat yang baru diekstraksi dan direndam dalam larutan fisiologis NaCl 0,9%. Selanjutnya, gigi dipecah dengan *mortar-pestle* untuk mengambil jaringan pulpa yang terdapat pada ruang pulpa dan masukkan dalam medium kultur pada cawan petri.

#### **4.6.3.3 Kultur Sel-sel Pulpa Gigi (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)<sup>28</sup>**

Jaringan pulpa gigi dihancurkan, lalu dipindahkan ke dalam *tube* 15 ml yang berisi medium kultur lengkap. Setelah itu, sampel dicuci 2 kali dengan cara disentrifugasi 2000 g selama 10 menit pada suhu 24°C. Selanjutnya, *supernatant* dibuang dan *pellet* yang terbentuk

**Universitas Indonesia**

dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap. Kemudian, sampel sel tersebut di kultur pada cawan petri yang berisi medium kultur lengkap pada inkubator CO<sub>2</sub> selama satu hingga dua malam atau sampai terlihat sel tumbuh padat merata (*confluent*). Selanjutnya sel-sel pulpa tersebut di panen menggunakan *scraper*, dan dikoleksi ke dalam *tube* 15 ml yang berisi medium kultur lengkap, lalu sel kembali disentrifugasi 2000 g selama 10 menit pada suhu 24°C. *Supernatant* dibuang dan *pellet* yang terbentuk dilarutkan kembali dengan sejumlah medium kultur lengkap. Setelah itu, jumlah sel dalam tiap mililiter sampel dihitung menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop (perbesaran 4x/0,10). Sel pulpa kemudian dikultur kembali (subkultur) pada *24-well plate* dengan jumlah sel pada setiap *well* adalah  $2 \times 10^5$  sel. Sel-sel pulpa gigi tersebut diinkubasi pada suhu 37° C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 1 malam.

#### **4.6.3.4 Pemaparan TEGDMA dengan konsentrasi 4 mM, 8 mM, dan 12 mM pada Kultur Sel-sel Pulpa Gigi**

Sel-sel pulpa yang telah dikultur selama 1 malam dipaparkan dengan TEGDMA konsentrasi 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Pemaparan TEGDMA dilakukan bersamaan dengan penggantian medium kultur lengkap. Pada kelompok kontrol hanya dilakukan penggantian medium kultur, tanpa pemaparan TEGDMA. Kemudian, *plate* tersebut diinkubasi kembali pada suhu 37° C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam.

#### **4.6.3.5 Pengukuran Protein Total Sel dengan *Bradford protein assay*<sup>35</sup>**

Setelah inkubasi selama semalam, seluruh medium kultur pada *24-well plate* dibuang. Lalu ditambahkan 200µl

**Universitas Indonesia**

trypsin EDTA ke dalam setiap *well*, biarkan selama 5 menit untuk melepaskan sel dari dasar *plate*, lalu tambahkan 300µl PBS ke dalam setiap *well*. Kemudian, pindahkan sel yang terlepas dari setiap *well* ke dalam *tube Eppendorf*. Sentrifugasi 3000g selama 10 menit pada suhu 24°C. Buang *supernatant* kemudian larutkan *pellet* dengan 1ml HEPES 10mM dan panaskan pada *Thermo-block* 100°C selama 10 menit, lalu sentrifugasi (3000g per menit) selama 10 menit pada suhu 24°C. Buang *supernatant*, lalu larutkan lagi *pellet* dengan 1000µl PBS, kemudian tambahkan 65µl SDS 10% dan panaskan dalam *water bath* (37°C) selama 5 menit. Ambil 160µl sampel sel pulpa dan pindahkan ke dalam 96-*well plate* (triplo), dan lakukan hal yang sama pada larutan protein standar BSA. Tambahkan 40µl larutan *Bradford* pada setiap *well* dan biarkan selama 5 menit pada suhu ruang. Baca konsentrasi protein sel menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 655nm.

#### 4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Sel dengan SDS-PAGE<sup>36,38-9,44</sup>

##### a. Periapan alat dan bahan

Siapkan perlengkapan SDS-PAGE yaitu plat kaca, bak elektroforesis, sisir, *guidance*, larutan *resolving gel*, dan *stacking gel*. Larutan *resolving gel* dimasukkan terlebih dahulu ke dalam plat kaca, dan tambahkan aquades di atasnya untuk menghindari pengerutan, biarkan 20 menit hingga mengeras. Kemudian masukkan larutan *stacking gel* di atasnya, letakkan sisir pembentuk *well* pada tempatnya segera setelah larutan *stacking gel* dimasukkan, biarkan selama 1 jam hingga gel mengeras. Angkat sisir perlahan dan letakkan plat kaca berisi gel tersebut ke dalam bak elektroforesis, kemudian isi bak dengan *SDS reservoir buffer* sampai gel terendam sempurna.

Universitas Indonesia

b. Persiapan sampel

Sampel sel yang sudah dipilih disentrifugasi 5000 g selama 10 menit pada suhu 24°C. Setelah terbentuk *pellet*, buang sebagian besar *supernatant* untuk mengkonsentrasikan sampel yang akan dielektroforesis. Kemudian, campurkan sampel sel dan *native sample buffer* dengan perbandingan 1:1 pada *tube Eppendorf* baru, dan panaskan sampel pada *Thermo-block* 100°C selama 10 menit untuk denaturasi kandungan protein sel.

c. Proses elektroforesis

Masukkan 20 µl sampel sel yang telah disiapkan ke tiap *well* pada gel, dan 10 µl *See BluePlus2 pre-stain standart* yang akan berperan sebagai acuan pada salah satu *well*. Setelah itu, lakukan proses elektroforesis yang terdiri dari 2 tahapan, yaitu P1 selama 30 menit dengan tegangan 100 V, arus sebesar 80 mA, dan daya sebesar 30 W, dan dilanjutkan dengan tahap P2 selama 2 jam dengan tegangan 100 V, arus sebesar 100 mA, dan daya sebesar 80 W.

d. Proses pewarnaan

Setelah proses elektroforesis selesai, gel dikeluarkan dari plat kaca dan dilakukan pewarnaan. Proses pewarnaan dilakukan dalam dua tahapan (*double staining*), yang terdiri dari :

- Pewarnaan pertama dengan *Coomassie blue* yang dibiarkan selama satu malam pada *orbital shaker* 40 rpm. Kemudian lakukan proses penghilangan bahan pewarna pada hari berikutnya, dengan *destaining solution* dua kali masing-masing selama 30 menit di atas *orbital shaker* 40 rpm.
- Pewarnaan kedua dengan metode *silver stain* yang tiap tahapnya dilakukan di atas *orbital shaker* 50 rpm. Namun, sebelum dilakukan prosedur *silver stain*, siapkan

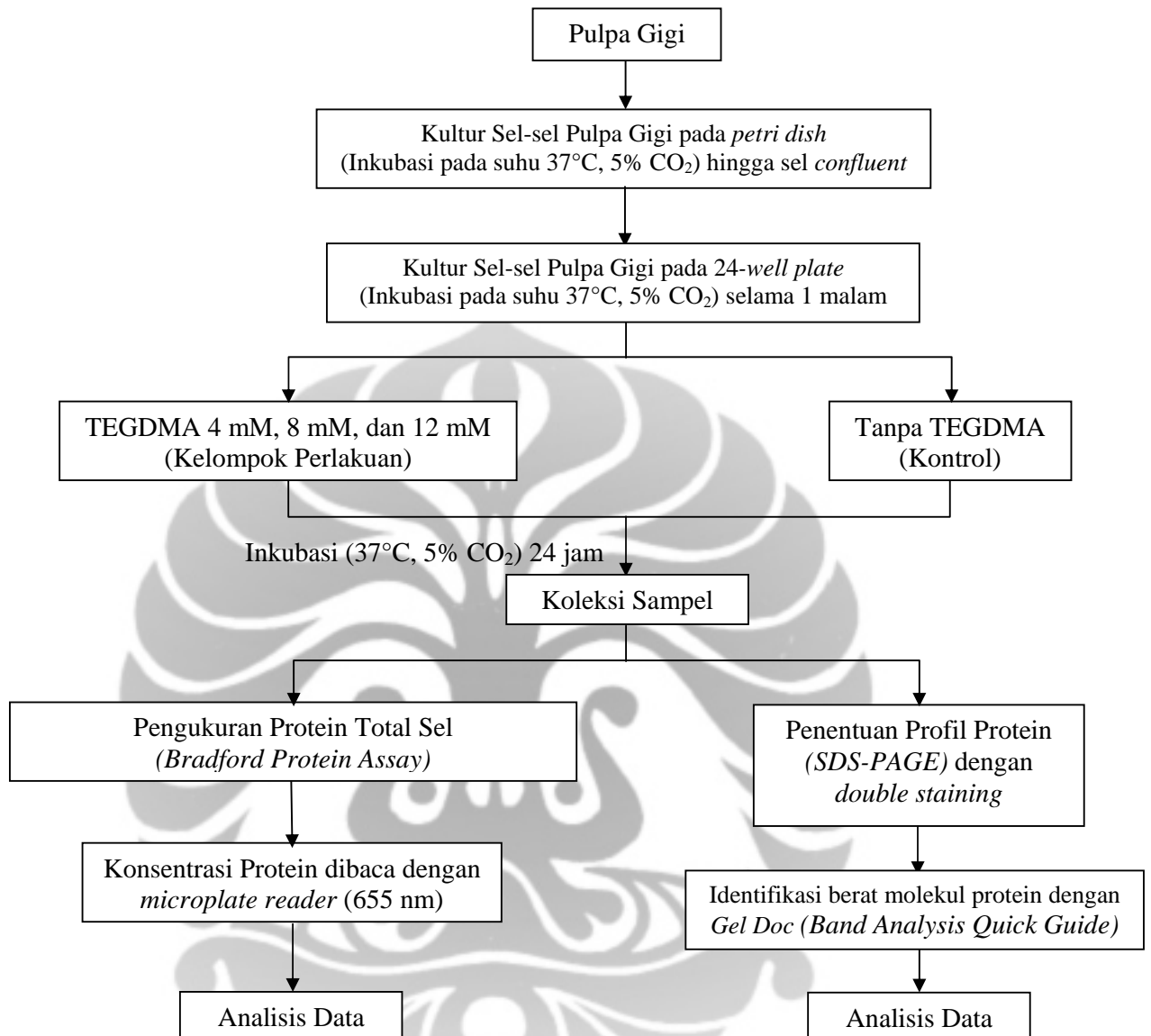
**Universitas Indonesia**



terlebih dahulu larutan-larutan yang dibutuhkan, yaitu : (1) *fixing solution*, (2) *oxidising solution*, (3) *staining reagent*, (4) *formaldehyde developer*, dan (5) *stop solution*.

Kemudian dilanjutkan dengan proses *silver stain* dengan langkah-langkah (modifikasi dari SIGMA. *ProteoSilver Silver Stain Kit, Product Information*. USA.) sebagai berikut : Pertama, fiksasi gel dengan *fixing solution* selama 60 menit, dalam kotak plastik bersih. Kemudian, ganti *fixing solution* dengan *oxidising solution* dan biarkan selama 10 menit. Cuci dengan *MilliQ water* 2 kali, masing-masing 10 menit, dalam kotak plastik bersih yang baru. Buang *MilliQ water*, ganti dengan *staining reagent* dan biarkan selama 7 menit, pada *orbital shaker* 70 rpm. Cuci kembali dengan *MilliQ water* selama 1 menit, kemudian segera ganti *MilliQ water* dengan *formaldehyde developer* selama 3 menit. Ganti *formaldehyde developer* dengan *stop solution* dalam 30 menit. Setelah itu, cuci dan simpan gel dengan *MilliQ water* dalam kotak plastik bersih yang baru. Tahap terakhir adalah identifikasi berat molekul *band-band* protein yang terbentuk pada gel dengan menggunakan *Gel Doc (Band Analysis Quick Guide)*.

#### 4.7 Alur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Perbedaan konsentrasi protein total sel antara kelompok Perlakuan dengan kelompok Kontrol, dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one way ANOVA*.

#### 4.9 Etik Penelitian

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