

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratotik.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel-sel pulpa dari gigi sehat yang baru diekstraksi di RSGM-P Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia 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 Variable Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

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

4.4.2 Variable Terikat

Protein total dan profil protein medium kultur (*in vitro*).

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-sel pulpa gigi adalah sel pulpa dari kultur primer sel-sel pulpa gigi sehat manusia yang baru di ekstraksi kurang dari 6 jam. sel-sel

pulpa yang dipakai adalah sel-sel pulpa hasil subkultur 2 sampai subkultur 3.

4.5.3 Protein Total Medium Kultur adalah protein total yang terkandung di dalam medium kultur, baik protein yang berasal dari medium itu sendiri atau protein yang disekresikan oleh sel. Protein total dapat diukur dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay* yang bekerja berdasarkan aksi perubahan warna Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (CBBG) pada saat berikatan dengan protein.

4.5.4 Profil Protein Medium Kultur adalah jenis-jenis protein yang terkandung dalam medium kultur. Analisa profil protein dilakukan dengan melihat perbedaan tampilan *band* pada gel electrophoresis. Teknik yang dipakai adalah SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yaitu suatu metode yang digunakan untuk menilai proses purifikasi dan menentukan berat molekul protein dengan jelas. Metode ini akan memisahkan protein berdasarkan berat molekul.

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 & BIOHT-Proline)
7. *Pipette Pasteur*
8. *Petri dish* (CORNING)
9. *Cell scrapper* (NUNC, Denmark)
10. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
11. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
12. 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 μm)

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_3 7,5%
9. *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%
10. *Fungizone* (Amphotericin B 250 UG/ml) produksi Gibco UK
11. *Fetal Bovine Serum* (FBS)
12. TEGDMA 3318mM produksi Sigma, USA
13. Larutan *Bradford* produksi Sigma, USA
14. Protein standar *bovine serum albumin* (BSA) 75.000 $\mu\text{g/ml}$ produksi GIBCO
15. *Trypan blue* (Sigma)
16. *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10%.
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_4OH (*Concentrate*)
30. 20% AgNO_3 (MERCK, Darmstadt, German)
31. *Citric Acid*
32. 37% *Formaldehyde*
33. *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

Universitas Indonesia

Mortar dan *pestle*, pinset, *scalpel*, jarum ekstirpasi, *MilliQ water*, tip pipet, *tube Eppendorf*, NaCl 0,9%, dan PBS disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit.

b. Pembuatan Medium Kultur Lengkap (dilakukan di dalam biohazard cabinet)

DMEM dilarutkan dengan *MilliQ water* sesuai dengan petunjuk pabrik, kemudian ditambahkan NaHCO₃ (2 g/L), *Penicillin Streptomycin* (1%) *Fungizone* (1%) dan FBS (10%). Selanjutnya, medium kultur tersebut disterilkan dengan menggunakan *syringe* 50 ml dengan '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 µm). Setelah itu, disimpan dalam lemari pendingin.

c. Pembuatan Protein Standar BSA dengan berbagai konsentrasi

Dibuat protein standar BSA 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1600 µg/ml, dan 3200 µg/ml dengan pelarut PBS.

4.6.3.2 Koleksi Sel-sel Pulpa

Sel-sel pulpa didapatkan dari gigi sehat yang baru di ekstraksi kurang dari 6 jam. Gigi yang baru diekstraksi disimpan dalam larutan NaCl 0,9% yang dimasukkan didalam kotak yang berisi es. Kemudian gigi dibersihkan dari jaringan lunak yang tertinggal dengan menggunakan *scalpel*. Setelah itu gigi dipecahkan dengan menggunakan *mortal and pastle*. Setelah gigi terbelah dan jaringan pulpa terlihat maka jaringan pulpa dapat diambil dengan jarum ekstirpasi atau menggunakan

pinset. Kemudian jaringan pulpa yang telah diambil dipindahkan kedalam cawan petri yang berisi medium.

4.6.3.3 Kultur Sel-sel Pulpa Gigi (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)³⁸

Jaringan pulpa gigi yang telah diambil dipindahkan kedalam cawan petri yang berisi medium. Kemudian jaringan pulpa dihancurkan dan dikoleksi ke dalam tube 15 ml. Kemudian dicuci 2x dengan cara disentrifugasi (2000 g) selama 10 menit. Selanjutnya, *supernatan* dibuang dan *pellet* yang terbentuk dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap kemudian *dipipetting* untuk memisahkan sel-sel pulpa. Setelah itu, sampel sel dibiakan pada cawan petri yang berisi medium komplet. Inkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂, dan medium diganti setiap hari. Jika sel telah terlihat *confluent* (± 2 hari) maka sel siap untuk dipanen dengan menggunakan *scraper*. Selanjutnya sel-sel pulpa tersebut 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, dilakukan perhitungan jumlah sel dalam setiap mililiter sampel dengan menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop (perbesaran 4x/0,10). Jumlah sel yang dikultur pada setiap *well* adalah 2×10^5 sel/ml. Sel-sel pulpa gigi tersebut diinkubasi pada suhu 37° C dan 5% CO₂ selama 24 jam.

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

Medium kultur diganti, kemudian pada kelompok perlakuan masing-masing dipapar dengan TEGDMA dengan konsentrasi 4mM, 8mM, dan 12mM. Sedangkan kelompok kontrol tidak dipapar TEGDMA. Selanjutnya, sel-sel pulpa gigi diinkubasi pada suhu 37° C dan 5% CO₂ selama 24 jam.

4.6.3.5 Pengukuran Protein total Medium Kultur dengan *Bradford Protein Assay*³⁹

Konsentrasi protein total medium kultur dapat diukur dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay*. Setelah inkubasi 24 jam, seluruh medium kultur pada *24-well plate* diaspirasi kemudian dipindahkan ke *tube Eppendorf*. selanjutnya dilakukan prosedur *Bradford Protein Assay* sebagai berikut: Masukkan 160 µl sampel medium kultur ke dalam *96-well plate* (triplo). Jumlah dan cara yang sama dilakukan juga untuk protein standar (BSA). Kemudian pada masing-masing sampel dan protein standar BSA ditambahkan 40 µl larutan *Bradford*. Sampel yang telah ditambahkan larutan *Bradford* diinkubasi selama 5 sampai 20 menit pada temperatur ruang. Konsentrasi protein medium kultur dapat dibaca menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 655nm. Konsentrasi protein dinyatakan dalam satuan µg/ml.

4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Medium Kultur dengan *SDS PAGE*⁴⁰⁻⁴²

a. Persiapan Gel

Siapkan perangkat SDS PAGE. Masukkan *resolving gel* dengan menggunakan pipet pasteur ke kaca *electrophoresis* dengan arah tegak lurus. Kemudian,

tambahkan *aquadest* diatas *resolving gel*. Diamkan selama 20 menit hingga gel mengeras. Setelah *resolving gel* mengeras, dengan cara yang sama masukan *stacking gel*. Masukan sisir diatas *stacking gel*. Diamkan selama 1 jam hingga *stacking gel* mengeras. Lepas sisir sehingga terbentuk *well*. Tempatkan kaca yang telah diisi dengan gel kedalam tank *electrophoresis*. Kemudian, tambahkan SDS *reservoir buffer* sampai batas bevel kaca. Setelah itu pasang sisir *guidance*.

b. Persiapan Sampel Protein

Ambil 20 μ l dari setiap sampel lalu masukan dalam *tube Eppendorf*. Kemudian, tambahkan 20 μ l *native sampel buffer* pada setiap sampel protein. Panaskan *tube Eppendorf* yang berisi sampel pada *Thermoblock* dengan suhu 100°C selama 5 menit. Persiapkan *See Blueplus2-Prestain Standart*.

c. Prosedur *Electrophoresis*

Setelah perangkat SDS PAGE siap, masukan 20 μ l sampel protein yang telah dipersiapkan ke dalam tiap-tiap *well*. Kemudian, masukan 10 μ l *See Blueplus2-Prestain Standart* kedalam salah satu *well* yang berfungsi sebagai standar protein. Setelah sampel masuk kedalam masing-masing *well*, dilakukan *running* SDS PAGE yang terdiri atas dua tahap yaitu tahap pertama (P1) dengan kondisi tegangan 100V, arus sebesar 80mA, dan daya sebesar 30W, selama 30 menit dan tahap kedua (P2) dengan kondisi tegangan 100V, arus sebesar 100mA, dan daya sebesar 80W, selama 2 jam. Setelah proses *electrophoresis* selesai, gel dikeluarkan dari kaca *electrophoresis* dan dilakukan proses pewarnaan.

d. Prosedur Pewarnaan

Prosedur pewarnaan dilakukan dalam dua tahap (*double stained*), pewarnaan pertama dengan menggunakan *Coomassie blue* dan pewarnaan kedua dengan *Silver stain*. Sebagai berikut :

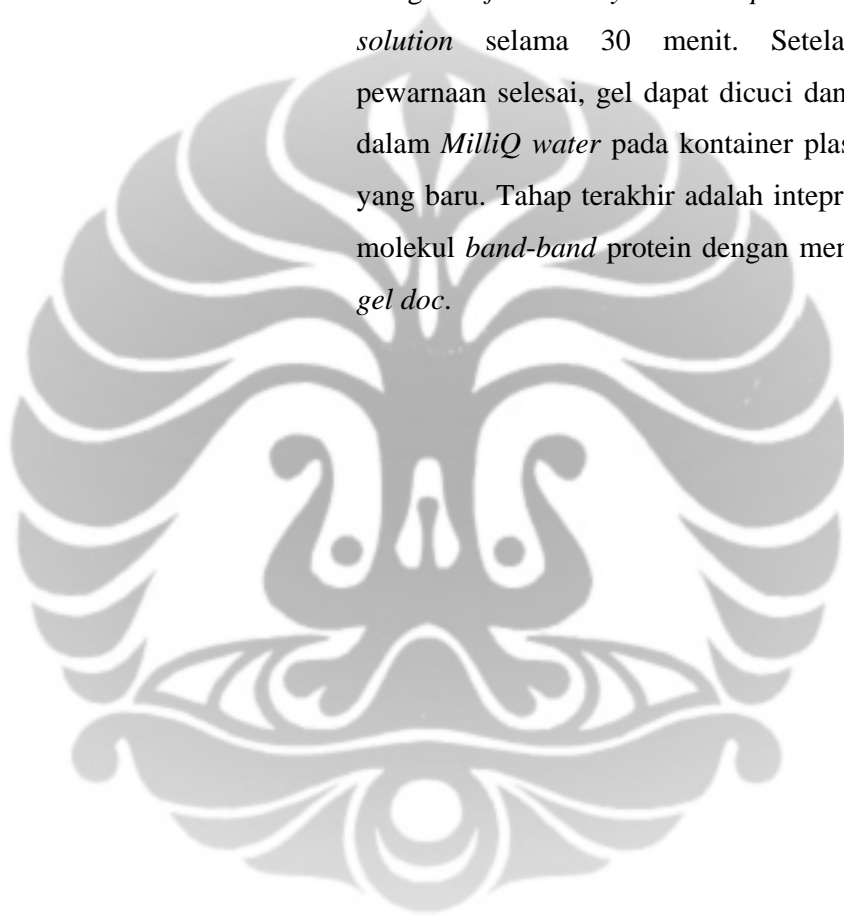
1. *Coomassie blue*

Gel dimasukkan kedalam kontainer plastik yang berisi *Coomassie blue*, letakan pada *orbital shaker* dengan kecepatan 0,4 rpm *overnight*. Selanjutnya dilakukan proses penghilangan bahan pewarna pada gel dengan larutan *destaining* (dengan perendaman), diletakan pada *orbital shaker* dengan kecepatan 0,7 rpm. Setelah 30 menit larutan *destaining* diganti (lakukan 2-3 kali). Setelah proses ini akan terlihat gambaran *band-band* protein.

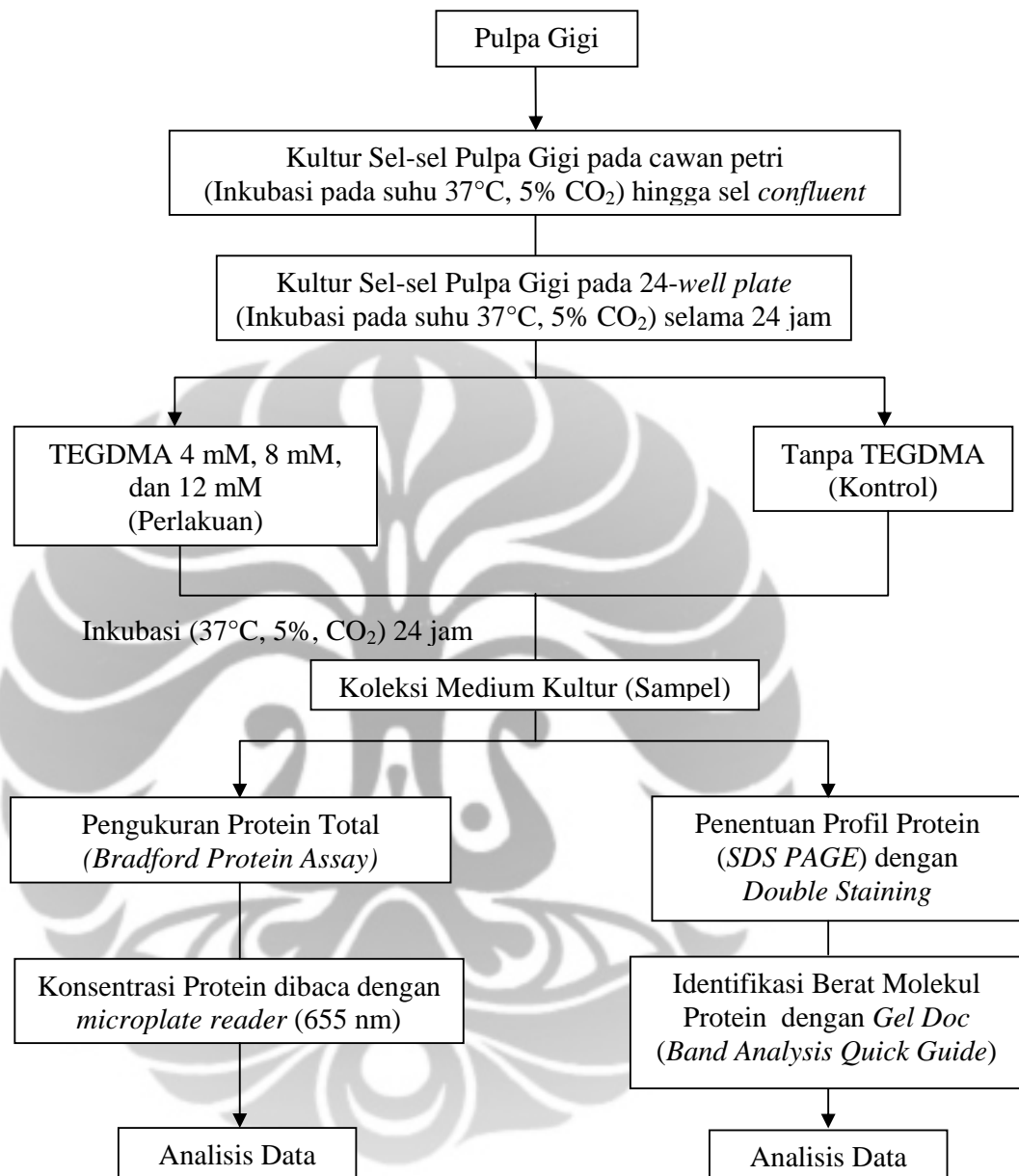
2. *Silver Stain*

Untuk memperjelas gambaran *band-band* protein dilakukan pewarnaan kedua dengan *Silver stain*. Semua tahap ini dilakukan diatas orbital shaker 50 rpm. Sebelum prosedur *Silver staining* dimulai, perlu dilakukan pembuatan beberapa larutan antara lain: (1) *fixing solution*, (2) *oxidising solution*, (3) *staining reagent*, (4) *formaldehyde developer*, dan (5) *stop solution*. Setelah larutan dipersiapkan, dapat dimulai prosedur *silver stain* dengan langkah-langkah (modifikasi dari SIGMA. *ProteoSilver Silver Stain Kit, Product Information*. USA) sebagai berikut: Fiksasi gel dengan *fixing solution* selama 60 menit, dalam kontainer plastik bersih. Setelah itu, ganti *fixing solution* dengan *oxidising solution* selama 10

menit. Kemudian cuci dengan *MilliQ water* 2 x 10 menit, dilakukan dalam kontainer plastik yang baru. Ganti *MilliQ water* dengan *staining reagent* maksimal 7 menit, pada orbital shaker 70 rpm. Setelah itu, cuci dengan *MilliQ water* selama 1 menit. Kemudian ganti *MilliQ water* dengan *formaldehyde developer* selama 3 menit. Setelah itu ganti *formaldehyde developer* dengan *stop solution* selama 30 menit. Setelah proses pewarnaan selesai, gel dapat dicuci dan disimpan dalam *MilliQ water* pada kontainer plastik bersih yang baru. Tahap terakhir adalah interpretasi berat molekul *band-band* protein dengan menggunakan *gel doc*.



4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Perbedaan konsentrasi protein total medium kultur 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 dari Komisi Etik Penelitian FKG UI pada tanggal 10 April 2008.

